

Université Paris Descartes

Ecole doctorale GC2iD

INSERM U1163, Institut Imagine, Immunogenetics of pediatric autoimmunity

Régulation de la réponse immunitaire T par l'apoptose et hyperactivation de la voie RAS

Thèse de doctorat

Sciences de la vie et de la santé, spécialité Immunologie

Présentée et soutenue publiquement le 21 octobre 2014

Par Nina Lanza

Devant un jury composé de :

Madame le Dr A.-O. Hueber

Rapporteure

Monsieur le Pr E. Solary

Rapporteur

Madame le Pr H. Cavé

Examinatrice

Monsieur le Dr F. Rieux-Laucat

Directeur de thèse

« Au pays de Perledeau, il fait nuit noire. »

La Chanson du vent,
Le Chantre de l'Autre monde

REMERCIEMENTS

Je remercie Madame le Docteur Anne-Odile Hueber d'avoir accepté d'être rapporteure de ce travail et d'apporter ainsi son éclairage et sa compétence aux discussions suscitées par les résultats présentés.

Je remercie Monsieur le Professeur Eric Solary qui a également endossé le rôle de rapporteur et effectué une lecture critique attentive de ce manuscrit. Ses remarques et questions enrichissantes permettront à ceux qui poursuivront le projet de s'engager sur de nouvelles pistes et ainsi le faire progresser.

Je remercie Madame le Professeur Hélène Cavé, examinatrice dans ce jury mais également instigatrice du projet en complicité avec mon directeur de thèse. Votre aide précieuse, votre disponibilité et votre gentillesse m'ont beaucoup touchée.

Je remercie Monsieur le Docteur Frédéric Rieux-Laucat, qui en tant que directeur de thèse m'a accueillie dans son laboratoire et m'a fait confiance en m'assignant à ce projet qu'il souhaitait développer dans son équipe. J'espère ne pas l'avoir déçu et laisser derrière moi un chantier certes, mais organisé et pouvant un jour laisser place à une construction stable. Merci Frédéric d'avoir également su tolérer ma volonté d'indépendance et mes initiatives ; et merci pour l'aide et le soutien que tu m'as apportés au gré de ta disponibilité.

Je remercie Madame le Professeur Marina Cavazzana qui depuis deux ans m'a accueillie dans son département et m'a aménagé un temps de travail au laboratoire en dépit des obligations médicales liées à la prise en charge pointue des nombreux patients qu'elle traite au sein de son hôpital de jour. Marina, votre professionnalisme et votre disponibilité ainsi que la gentillesse que vous m'avez témoignée resteront pour moi un souvenir agréable.

Je remercie la FRL-team : les permanentes, Marie-Claude, qui m'a formée au début et aidée tout du long, Aude, soutenance et généreuse, Bénédicte, toujours de bon conseil et

Fabienne, que j'ai connue tardivement. Et les non-permanents, Eva, une amie qui le restera, Julien, qui comme moi s'en va et Nadia.

J'ai eu l'occasion de côtoyer tous les jours depuis deux ans à l'unité d'hémaphérèse les Docteurs Jean-Antoine Ribeil et François Lefrère, qui se sont montrés très compréhensifs et soutenant, chacun à sa manière il faut le dire, François de façon plutôt paisible, et Jean-Antoine de façon plus dynamique.

J'aimerais également parler de Brigitte, qui est bien plus que la secrétaire, le pivot du service, d'un professionnalisme épatant et d'une gentillesse, d'une écoute et d'un calme sans limites. Les infirmières et aides-soignantes de l'UTT m'ont aussi bien aidée et je les remercie pour tout, y compris leur compétence pointue et leur rigueur dans l'exercice de leurs fonctions. En plus, elles m'ont fait courir et ça, c'était pas couru d'avance.

Et puis il y a toutes les personnes que j'ai côtoyées à l'unité INSERM U768 puis à Imagine, certaines plus que d'autres, comme Marine, avec qui je continuerai de faire des expéditions enjouées à Bobigny (et ailleurs !), Shabi, avec qui j'ai partagé un bureau et des confidences, Mathieu, qui aide tout le monde ; et bien d'autres encore.

Enfin, et heureusement, il y a Vincent.

RÉSUMÉ

L'apoptose lymphocytaire joue un rôle essentiel dans le contrôle de la réponse immunitaire et de la prolifération cellulaire. De nombreuses voies interviennent dans sa régulation, dont certaines dépendantes de l'oncogène *RAS*. Un défaut d'apoptose lymphocytaire induit l'apparition de maladies auto-immunes et lympho-prolifératives comme l'Autoimmune LymphoProliferative Syndrome (ALPS). L'ALPS fait suite à des anomalies du principal récepteur membranaire de mort *FAS*, pivot de l'apoptose lymphocytaire.

Le *RAS*-Associated Lymphoproliferative Disease (RALD) est une entité décrite récemment, se rapprochant de l'ALPS par la symptomatologie et la physiopathologie sous-jacente. Cependant, dans le RALD, le défaut d'apoptose lymphocytaire n'est pas lié à des mutations de *FAS* mais à une hyperactivation de la voie *RAS*, mettant ainsi en lumière le rôle essentiel de cette voie dans la régulation du processus en question.

Dans les Leucémies Myélo-Monocytaires Juvéniles Chroniques (JMML), les mêmes mutations que celles observées dans les RALD sont trouvées, sur les mêmes populations cellulaires. Il existe une hétérogénéité clinique et biologique au sein des JMML, certaines étant indolentes (LS-JMML) et d'autres sévères (S-JMML). A cette hétérogénéité au sein même des JMML s'ajoute celle observée entre JMML et RALD.

L'objectif de ce travail a été de comprendre les tenants des différences phénotypiques observées, au travers du scope de l'apoptose des lymphocytes T activés, en comparant les trois entités résultant de mutations activatrices de *RAS* dans des cellules pluripotentes hématopoïétiques : RALD, LS-JMML et S-JMML. Nous rapportons des conséquences distinctes pour des mutations identiques ou équivalentes, avec différentes voies de l'apoptose touchées, différenciant les phénotypes induits.

Ce travail a permis de démontrer que l'hyperactivation de la voie *RAS* seule n'entraîne pas nécessairement une dérégulation de la réponse immunitaire T. Des événements additionnels aux mutations présentes sont nécessaires au développement

des symptômes. Ces événements ont bien des conséquences sur l'apoptose lymphocytaire, au niveau post-traductionnel, qu'ils concernent la voie RAS ou non.

Les différences observées entre les trois phénotypes sur le plan expérimental pourraient être une aide au pronostic. De plus, ce travail ouvre la voie à l'identification en détails des facteurs additionnels et voies défailantes et permettrait ainsi d'obtenir des thérapeutiques spécifiques actuellement inexistantes.

Mots clés :

Activated cells autonomous death, Activation induced cell death, Autoimmunité, Apoptose, Leucémie myélo-monocytaire juvénile chronique, Lymphocytes T, Lymphoprolifération, Myéloprolifération, MAP Kinases, Oncogène RAS

ABSTRACT

Influence of RAS hyperactivity on T cells apoptosis during the immune response

Lymphocytes apoptosis is essential in maintaining homeostasis and avoiding abnormal proliferation. When defective, autoimmune diseases as the Autoimmune LymphoProliferative Syndrome (ALPS), due to mutations of the death receptor *FAS*, can occur. Several pathways are important actors influencing the apoptosis cascade, including the *RAS* proto-oncogene signaling. The *RAS* Associated Lymphoproliferative Disease (RALD) is a newly described entity, similar to ALPS but with *RAS* mutations instead of *FAS* mutations, enlightening the primary role of *RAS* in apoptosis regulation. Interestingly, the same *RAS* mutations as observed in RALD are also the cause of a malignant proliferation, the Juvenile Myelo Monocytic Leukemia (JMML). In the case of JMML, *RAS* mutations can lead either to a mild (LS-JMML) or a severe (S-JMML) phenotype. Thus, three different phenotypes can be caused by the same oncogenic *RAS* mutations. In order to better understand and characterize the influence of oncogenic *RAS* mutations in lymphocytes' apoptosis we studied it in patients presenting with RALD, LS-JMML and JMML. We showed that isolated *RAS* hyperactivity is not sufficient to induce an immune deregulation. Additional factors are required to do so. These factors influence both mitochondrial and extrinsic apoptosis pathways at a post-transcriptional level. They are due to probable genetic events, and their identification can lead to new therapeutic strategies. Furthermore, activated lymphocytes' *in vitro* apoptosis assessment can help differentiating the three phenotypes and thus facilitate prognosis prediction.

Keywords :

Activated cells autonomous death, Activation induced cell death, Autoimmunity, Apoptosis, Juvenile myelo-monocytic leukemia, T Lymphocytes, Lymphoproliferation, Myeloproliferation, MAP Kinases, *RAS* Oncogène

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS	5
RÉSUMÉ	7
ABSTRACT	9
TABLE DES MATIERES	11
ABRÉVIATIONS	15
TABLE DES ILLUSTRATIONS	19
FIGURES	19
TABLEAUX	20
I. INTRODUCTION	22
A. APOPTOSE LYMPHOCYTAIRE	23
1. ÉTYMOLOGIE	23
2. HISTORIQUE	23
3. DEFINITION ET ROLES	26
4. DESCRIPTION	27
a) Voie extrinsèque	27
b) Voie intrinsèque	30
c) Les caspases effectrices et leurs cibles	32
d) L'apoptose indépendante des caspases	34
5. REGULATION DE L'APOPTOSE	36
a) Transmission du signal : les decoy receptors	36
b) Modifications post-traductionnelles de FAS	36
c) Inhibition du DISC : FLIP	37
d) Inhibition de la voie mitochondriale :	37
(1) Heat Shock Proteins	37
(2) Membres anti-apoptotiques de la famille BCL-2	39
e) Inhibition et régulation des caspases :	40
(1) Inhibitory Apoptosis Proteins	40
(2) SMAC et HTRA2	41
f) Les facteurs de transcription	42
(1) <i>NF-κB</i>	42
(2) <i>AP-1</i>	44
(3) <i>FoxOs</i>	44
(4) <i>P53</i>	45
B. APOPTOSE ET REPONSE IMMUNITAIRE T	47
1. REPONSE IMMUNITAIRE T	47
2. CONTROLE DE LA REPONSE IMMUNITAIRE T PAR L'APOPTOSE	49
a) Activation Induced Cell Death	49
b) Activated Cells Autonomous Death	51
3. DEFAUTS DE CONTROLE DE LA REPONSE IMMUNITAIRE T PAR L'APOPTOSE	52
a) Autoimmune LymphoProliferative Syndrome	52
b) RAS-Associated Lymphoproliferative Disease	53
C. VOIE RAS	54
1. GENERALITES SUR L'ONCOGENE RAS	54
2. ACTIVATION NORMALE DES PROTEINES RAS	55

3.	VOIE RAS DANS LES LYMPHOCYTES T	56
4.	VOIE RAS ET APOPTOSE	58
a)	PI3K et apoptose	58
b)	RAC et apoptose	59
c)	RAF-MEK-ERK et apoptose	59
(1)	Inhibition de l'apoptose par MEK-ERK	60
(a)	Inhibition de la voie extrinsèque	60
(b)	Inhibition de la voie intrinsèque	60
(c)	Inhibition par XIAP	61
(2)	Promotion de l'apoptose par MEK-ERK	61
5.	MUTATIONS ACTIVATRICES DE <i>RAS</i>	63
6.	PATHOLOGIES LIEES A UNE ACTIVATION ANORMALE DE <i>RAS</i>	64
a)	Mutations germinales	64
b)	Mutations somatiques	65
(1)	Cancers et hémopathies malignes	65
(2)	Leucémies Myélo-Monocytaires Juvéniles chroniques	66
(3)	<i>RAS</i> Associated Lymphoproliferative Disease	68
D.	OBJECTIFS ET MÉTHODOLOGIE	70
II.	RÉSULTATS	74
A.	ARTICLE 1	74
	<i>RAS</i>-ASSOCIATED LYMPHOPROLIFERATIVE DISEASE EVOLVES INTO SEVERE JUVENILE MYELO-MONOCYTIC LEUKEMIA	74
B.	ARTICLE 2	82
	APOPTOSIS DISCRIMINATES BETWEEN MILD AND SEVERE <i>RAS</i> MUTATED JUVENILE MYELOMONOCYTIC LEUKEMIA	82
C.	RÉSULTATS SUPPLÉMENTAIRES	109
1.	CONCERNANT LE RALD, P1	109
a)	Le défaut d'ACAD et la diminution de BIM sont indépendants de la mutation de KRAS	109
b)	Identification de mutations germinales sur la voie RAS/MAPK	111
2.	CONCERNANT LES S-JMML, P4, P5, P6	115
a)	Le défaut d'activation ou de l'activité des caspases n'influence pas l'ACAD	115
b)	Facteurs s'ajoutant à RAS	116
(1)	Pas d'anomalies majeures de la méthylation	117
(2)	Profil d'expression des MicroARN	118
(a)	Variations communes à P4 et P5	118
(b)	Expressions augmentées	119
(c)	Expressions diminuées	119
(3)	Séquençage de l'exome	121
(a)	P4	121
(i)	SIVA1	121
(ii)	IL12RB1	124
(b)	P5	125
(c)	P6	126
III.	DISCUSSION - PERSPECTIVES	130
A.	CONCERNANT LE CAS DE RALD	130
1.	LES DONNÉES DE LA LITTÉRATURE REPRODUITES...	130
2.	... COMPLÉTÉES...	130
3.	... MISES EN PERSPECTIVE	131
B.	CONCERNANT LES CAS DE JMML	132
1.	LE DÉFAUT D'ACAD N'EST PAS SYSTÉMATIQUE	132
2.	LE DÉFAUT D'AICD	132

a)	Est discriminant	132
b)	Est en rapport avec des anomalies des caspases	133
c)	Et une transcription (a)normale ?	134
d)	N'est pas corrélé à l'hyperactivation de la voie RAS	136
e)	Les données du miRNome et de l'exome ouvrent les perspectives	136
IV.	CONCLUSION	140
V.	ANNEXES	144
A.	ARTICLE 1 SOUS FORME PUBLIEE	144
B.	ARTICLE 3 SOUS FORME PUBLIEE	148
C.	LUMA	151
D.	EXOME	152
VI.	BIBLIOGRAPHIE	154

ABRÉVIATIONS

ACAD	Activated cells autonomous death
ACK1	Activated CDC42 kinase 1
ADN	Acide désoxyribonucléique
AICD	Activation induced cell death
AIF	Apoptosis inducing factor
ALPS	Autoimmune lymphoproliferative syndrome
AP1	Activator protein 1
APAF1	Apoptotic protease activating factor 1
ATF	Cyclic AMP-dependent transcription factor
ATP	Adenosine triphosphate
BAG3	Bcl-2 associated athanogene domain 3
BAK	Bcl-2 homologous antagonist killer
BAX	Bcl-2-associated X protein
BCL	B-cell lymphoma
BH	BCL-2 homology domain
BID	BH3 interacting-domain death agonist
BIM	BCL-2 interacting mediator of cell death
BIR	Baculoviral IAP repeat
CA ⁺⁺	Calcium
CAD	Caspase-activated DNase
CARD	Caspase recruitment domains
CARMA1	CARD-containing MAGUK protein 1
CASPASE	CysteinyI-aspartate-cleaving proteases
CBL	Casitas B-lineage Lymphoma
CD	Cluster de différenciation
cDNA	ADN complémentaire
CFC	Cardio-facio-cutané
CPA	Cellule présentatrice d'antigène
DAG	Diacylglycérol
DCR	Decoy recepteur
DD	Death domain

DED	Death effector domain
DISC	Death inducing signaling complex
DLC1	Deleted in liver cancer 1
DR	Death receptor
EGF	Epidermal growth factor
EGR	Early growth response
ELK1	ETS domain-containing protein
ENDO G	Endonucléase G
ERK	Extracellular signal-regulated kinases
FAS	Apoptosis stimulating Fragment
FLICE	FADD-like ICE
FLIP	Cellular FLICE-inhibitory protein
FAT	Focal adhesion targeting
FOS	Finkel-Biskis-Jinkins osteogenic sarcoma
FOXO	Forkhead box O
GAP	GTPase activating proteins
GAPDH	Glycéraldéhyde 3 phosphate déshydrogénase
GF	Growth factor
GFR	Growth factor receptor
GM-CSF	Granulocyte macrophage colony stimulating factor
GNEF	Guanine nucleotide exchange factor
GRB2	Growth factor receptor bound protein 2
GTP	Guanosine triphosphate
HPK1	Hematopoietic progenitor kinase 1
HSP	Heat shock protein
HTRA2	High temperature requirement serine protease A2
IAP	Inhibitor of apoptosis
ICAD	Inhibitor of caspase-activated DNase
ICE	IL-1 beta-converting enzyme
IKB	Inhibitor of NF- κ B
IKK	I κ B kinase
IL	Interleukine
IL12RB1	Chaîne Béta 1 de l'IL12R

ILR	Interleukin receptor
IP3	Inositol trisphosphate
ITAM	Immunoreceptor tyrosine-base activation motifs
JMML	Juvnile myelomonocytic leukemia
JNK	Jun N-terminal kinase
LAT	Linker for activation of T cells
LCK	Lymphocyte-specific protein-tyrosine kinase
LTCD4	Lymphocyte T CD4
LTCD8	Lymphocyte T CD8
LTDN	Lymphocyte T double négatif
MAC	Mitochondrial Apoptosis-Induced Channel
MAF	Musculoaponevrotic fibrosarcoma oncogene homolog
MALT	Mucosa-associated lymphoma translocation protein
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
MCL1	Myeloid cell leukemia 1
MDM2	Murine double minute 2
MEK	MAPK/Erk kinase
NADH	Nicotinamide adénine dinucléotide
NF1	Neurofibromatose de type 1
NFAT	Nuclear factor of activated T-cells
NFkB	Nuclear factor kappa B
PARP	Poly(ADP-ribose)polymerase
PI3K	Phosphoinositide 3 kinase
PIP2	Phosphatidylinositol 3,4-bisphosphate
PKB ou AKT	Protein kinase B
PKC	Protein kinase C
PLC	Phospholipase
PP2A	Protein phosphatase 2A
PTPN11	Tyrosine-protein phosphatase non-receptor type 11
PUMA	p53 upregulated modulator of apoptosis
RAC	Ras-related C3 botulinum toxin substrate
RAF	Rapidly Accelerated Fibrosarcoma
RALD	RAS associated lymphoproliferative disease

RAP	Ras-related protein
RAS	Rat sarcoma
RE	Réticulum endoplasmique
RING	Really Interesting New Gene
RIP	Receptor interacting protein
ROCK	Rho-associated, coiled-coil-containing protein kinase
SEE	Staphylococcal enterotoxin E
SH	Src homology
SMAC	Second mitochondria-derived activator of caspase
SOS	Son of sevenless guanine nucleotide exchange factor
SRC	Rous sarcoma oncogene cellular homolog
STAT	Signal transducer and activator of transcription
TCR	T cell receptor
TEMRA	T8 effector memory CD45RA+
TNF	Tumor necrosis factor
TNFRSF	TNF receptor superfamily
TRADD	TNF receptor-1-associated death domain protein
TRAF	TNF receptor-associated factor
TRAIL	TNF-related apoptosis-inducing ligand
TRAILR	TNF-related apoptosis-inducing ligand receptor
TWEAK	TNF like weak inducer of apoptosis
UV	Ultraviolets
WT	Wild type, sauvage
XIAP	X linked mammalian inhibitor
ZAP	Z-chain-associated protein kinase
ZVAD	Carbobenzoxy-valyl-alanyl-aspartyl-[O-methyl]

TABLE DES ILLUSTRATIONS

Figures

FIGURE 1 : EXTRAIT DE « DES INSTRUMENTS DE RÉDUCTION », CHAPITRE 35, HIPPOCRATE	23
FIGURE 2 : EXTRAIT DE « DES INSTRUMENTS DE RÉDUCTION », CHAPITRE 35, HIPPOCRATE	23
FIGURE 3 : A GAUCHE EXTRAIT DU DICTIONNAIRE UNIVERSEL DE MÉDECINE, DE CHIRURGIE, D'ANATOMIE, DE CHIMIE, DE PHARMACIE, DE BOTANIQUE, D'HISTOIRE NATURELLE, ETC. A DROITE EXTRAIT DU DICTIONNAIRE GREC – FRANÇAIS COMPOSÉ SUR UN NOUVEAU PLAN.....	24
FIGURE 4 : EXPLICATIONS DU PROCESSUS D'APOPTOSE LORS DE SA PREMIÈRE DESCRIPTION SCIENTIFIQUE DANS SON ACCEPTATION ACTUELLE.....	25
FIGURE 5 : REPRÉSENTATION SCHÉMATIQUE DES RÉCEPTEURS ET LIGANDS DE LA SUPERFAMILLE DES TUMOR NECROSIS FACTORS, D'APRÈS AGGARWAL BB ET AL. ¹³	28
FIGURE 6 : REPRÉSENTATION SCHÉMATIQUE DE LA FORMATION DES DISCS APRÈS LIAISON DE FAS ET DE SON LIGAND, D'APRÈS LAVRIK ET AL. ¹⁵	29
FIGURE 7 : REPRÉSENTATION SCHÉMATIQUE DES CASPASES, D'APRÈS RIEDL SJ ET AL. ¹⁷	30
FIGURE 8 : REPRÉSENTATION SCHÉMATIQUES DES PROTÉINES DE LA FAMILLE DE BCL-2 D'APRÈS STRASSER. ¹⁸	31
FIGURE 9 : REPRÉSENTATION SCHÉMATIQUE DES VOIES EXTRINSÈQUE ET INTRINSÈQUE DE L'APOPTOSE LYMPHOCYTAIRE T	35
FIGURE 10 : INHIBITION DE L'APOPTOSE PAR LES PROTÉINES HSP, D'APRÈS LANNEAU ET AL. ⁵⁸	38
FIGURE 11 : REPRÉSENTATION SCHÉMATIQUE DES IAPs, D'APRÈS GYRD-HANSEN ET MEIER. ⁷⁵	40
FIGURE 12 : REPRÉSENTATION SCHÉMATIQUE DE L'ACTIVATION DE NF- κ B LORS DE LA STIMULATION DU TCR D'UN LYMPHOCYTE T MATURE, D'APRÈS GERONDAKIS ET AL. ⁹¹	43
FIGURE 13 : REPRÉSENTATION DÉTAILLÉE DE LA RÉGULATION DE L'APOPTOSE LYMPHOCYTAIRE T	46
FIGURE 14 : REPRÉSENTATION SCHÉMATIQUE DE LA SIGNALISATION INTRACELLULAIRE INDUITE PAR LA STIMULATION DU TCR, D'APRÈS BROWNLIE ET AL. ¹³⁰	48
FIGURE 15 : REPRÉSENTATION SCHÉMATIQUE DU CONTRÔLE DE LA RÉPONSE IMMUNITAIRE T D'APRÈS BRENNER ET AL. ¹³²	50
FIGURE 16 : REPRÉSENTATION SCHÉMATIQUE DE L'AICD ET DE L'ACAD	50
FIGURE 17 : REPRÉSENTATION SCHÉMATIQUE DE L'ACTIVATION DE LA VOIE RAS ET DE SES EFFECTEURS, D'APRÈS SCHUBBERT ET AL. ¹⁸⁴	55
FIGURE 18 : REPRÉSENTATION SCHÉMATIQUE DE L'ACTIVATION DE RAS LORS DE LA STIMULATION DU TCR, D'APRÈS GENOT ET AL. ²⁰⁰	57
FIGURE 19 : REPRÉSENTATION SCHÉMATIQUE DE L'INFLUENCE DE RAS SUR L'APOPTOSE INDÉPENDAMMENT DU TYPE CELLULAIRE ET DU STIMULUS, D'APRÈS COX ET DER. ²¹⁵	59
FIGURE 20 : EFFETS DE RAS/ERK SUR P53, P14ARF EST L'HOMOLOGUE HUMAIN DE P19ARF, D'APRÈS RIES ET AL. ²⁵²	62
FIGURE 21 : REPRÉSENTATION SCHÉMATIQUE DES ISOFORMES DE RAS, D'APRÈS SCHUBBERT ET AL. ¹⁸⁴	64
FIGURE 22 : COMPARAISON DES PHÉNOTYPES BIOCHIMIQUES DES FIBROBLASTES ET LYMPHOCYTES T ACTIVÉS DE P1	110
FIGURE 23 : WESTERN BLOTT SUR FIBROBLASTES CONTRÔLES ET DE P1. CTRL : CONTRÔLE, Th : THAPSIGARGINE.	111
FIGURE 24 : REPRÉSENTATION SCHÉMATIQUE DE LA STRUCTURE DE LA PROTÉINE SRC ET DE SES DOMAINES, D'APRÈS FRAME ET AL. ²⁸⁸	112
FIGURE 25 : REPRÉSENTATION SCHÉMATIQUE DE LA RÉGULATION DE SRC, D'APRÈS YEATMAN. ²⁸⁹	112
FIGURE 26 : SÉQUENÇAGE DE SRC CENTRÉ SUR LA MUTATION C.974T>G POUR P1	113
FIGURE 27 : APOPTOSE INDUITE PAR FAS ET ACAD AVEC OU SANS ZVAD CHEZ UN CONTRÔLE.	115
FIGURE 28 : ACAD SANS OU EN PRÉSENCE DE ZVAD	116
FIGURE 29 : REPRÉSENTATION SCHÉMATIQUE DE L'IMPLICATION DE SIVA1 DANS L'AICD.....	121
FIGURE 30 : REPRÉSENTATION SCHÉMATIQUE DU GÈNE ET DE LA PROTÉINE SIVA1	122
FIGURE 31 : SUPPRESSION DES SITES D'ÉPISSAGE DE SIVA1 PAR LA MUTATION C.417C>T.....	122
FIGURE 32 : BCL-XL EST SUREXPRIMÉ CHEZ P4.	123
FIGURE 33 : LE TRANSCRIT SIVA1 EST EXPRIMÉ DANS LES LYMPHOCYTES T ACTIVÉS DE P4	123
FIGURE 34 : SÉQUENÇAGE DE SIVA1 SUR L'ADN DE LYMPHOCYTES T4	124
FIGURE 35 : PCR QUANTITATIVE SUR SIVA1 POUR P4 ET SES CONTRÔLES	124
FIGURE 36 : SCHÉMA RÉCAPITULATIF DES ÉVÉNEMENTS AJOUTÉS AUX MUTATIONS DE RAS POUVANT CONCOURRIRE À EXPLIQUER LES DIFFÉRENCES PHÉNOTYPIQUES OBSERVÉES	138
FIGURE 37 : REPRÉSENTATION SCHÉMATIQUE DES CONCLUSIONS DU TRAVAIL	141

Tableaux

TABEAU 1 : RÉCEPTEURS DE MORT CONNUS.....	27
TABEAU 2 : PROTÉINES DE LA FAMILLE DE BCL-2	31
TABEAU 3 : NOMENCLATURE, DOMAINES, CIBLES ET INTERACTIONS DES IAP	41
TABEAU 4 : MUTATIONS SOMATIQUES DE RAS SELON LA 67 ^{ÈME} VERSION DU CATALOGUE DES MUTATIONS SOMATIQUES DANS LES CANCERS, SONT LISTÉS LES CANCERS POUR LESQUELS ON RETROUVE AU MOINS 15% DE MUTATIONS DE RAS, D'APRÈS STEPHEN ET AL. ²⁶⁶	65
TABEAU 5 : CRITÈRES DIAGNOSTIQUES DES JMML.....	67
TABEAU 6: ENSEMBLE DES CAS DE RALD, SUSPICIONS DE RALD, LS-JMML PRÉSENTANT DES STIGMATES D'AUTO-IMMUNITÉ PUBLIÉS..	68
TABEAU 7 : GÈNES CANDIDATS ET LEURS MUTATIONNS RETENUS EN SECONDE INTENTION APRÈS ANALYSE DE L'EXOME DE P1.	114
TABEAU 8 : RÉSULTATS DE L'ÉTUDE DE LA MÉTHYLATION EN LUMA	117
TABEAU 9 : PROFILS D'EXPRESSION DES MICROARN DES PATIENTS ATTEINTS DE JMML	120
TABEAU 10 : VARIATIONS RETROUVÉES LORS DE L'ANALYSE DE L'EXOME POUR P5	126
TABEAU 11 : VARIANTS RETROUVÉS LORS DE L'ANALYSE DE L'EXOME POUR P6, AYANT UN RAPPORT AVEC L'APOPTOSE ET / OU LA VOIE RAS / MAPK ET / OU LES CANCERS.	127
TABEAU 12 : GÈNES FAVORIASANT L'APOPTOSE PAR LA VOIE MITOCHONDRIALE DONT L'EXPRESSION EST AUGMENTÉE.....	134
TABEAU 13 : TRANSCRIPTION EN FAVEUR DE L'ACTIVATION DU NF-kB AU COURS DE L'AICD DE P4.....	135
TABEAU 14 : TRANSCRIPTION EN DÉFAVEUR DE L'APOPTOSE AU COURS DE L'AICD DE P5.....	135
TABEAU 15 : RÉCAPITULATIF DE LA CORRÉLATION ENTRE MUTATION DE RAS ET ACTIVITÉ DE LA VOIE RAS/MAPK/ERK	136
TABEAU 16 : DÉTAILS DE L'ANALYSE DE LA MÉTHYLATION, PAR LUMA 1/2	151
TABEAU 17 : DÉTAILS DE L'ANALYSE DE LA MÉTHYLATION, PAR LUMA 2/2	151
TABEAU 18 : VARIANTS DE P4 NON DÉCRITS SUSCEPTIBLES DE MODIFIER LA FONCTION DE LA PROTÉINE MAIS DONT LA PERTINENCE AVEC LE PHÉNOTYPE CLINIQUE ET BIOLOGIQUE EST FAIBLE.	152

INTRODUCTION

I. INTRODUCTION

La mort cellulaire programmée, autrement appelée apoptose, est un mécanisme clef de contrôle de la prolifération cellulaire. Au sein du système immunitaire, ce contrôle est essentiel. Il intervient lors de la maturation de ce dernier puis au cours du développement et de la sélection des lymphocytes. Ultérieurement, au niveau des lymphocytes T matures, l'apoptose joue un rôle central lors de la régulation de la réponse immunitaire, qu'elle soit déclenchée par un antigène étranger ou qu'elle soit auto-immune. Enfin, elle est essentielle dans le contrôle de la prolifération tumorale.

Ce sont des signaux de mort qui, perçus par la cellule, déclenchent des cascades d'activation de protéines aboutissant à l'apoptose. A contrario, d'autres signaux perçus par la cellule peuvent déclencher des cascades d'activation de protéines menant à la prolifération cellulaire et inhibant l'apoptose. La voie initiée par l'activation des protéines RAS en est un exemple. Elle est particulièrement active dans la lignée hématopoïétique.

L'objectif de ce travail est de mettre en lumière les interactions existant entre l'apoptose lymphocytaire T et l'activation anormale de la voie RAS au cours de la réponse immunitaire T, à partir d'un modèle pathologique reposant sur des mutations activatrices de la voie RAS dans le système hématopoïétique.

Ce modèle pathologique est appelé RAS associated lymphoproliferative disease (RALD) ou leucémie myélomonocytaire juvénile chronique (JMML) selon les symptômes présentés par les malades résultant des mêmes mutations. Nous verrons que la régulation apoptotique de la réponse immunitaire T dans ces deux configurations est différente, et soutiendrons comment et pourquoi l'apoptose peut permettre de comprendre les déterminants évolutifs de ces maladies.

A. APOPTOSE LYMPHOCYTAIRE

1. Étymologie

Le mot apoptose est composé de la préposition ΑΠΟ, qui en grec ancien signifie “hors de” ou qui en tant qu’adverbe est traduit par “loin de” et introduit ainsi la notion de distanciation, de séparation. Le mot ptose en français signifie chute, mais est issu du verbe ΠΙΠΤΩ, au futur ΠΤΩΣΩ, tomber mort, périr, être taillé en pièces, être tué¹. La traduction littérale de l’apoptose serait donc : Périra séparé, tombera mort au loin.

2. Historique

L’aposition de ΑΠΟ et ΠΙΠΤΩ ou ΠΤΩΣΩ est trouvée pour la première fois au IV^{ème} siècle avant l’ère chrétienne dans le traité d’Hippocrate “Des instruments de réduction”, au chapitre 35, où il traite de la gangrène des membres² (Figures 1 et 2). Il utilise la formule apoptose pour décrire le détachement, la chute des os morts.

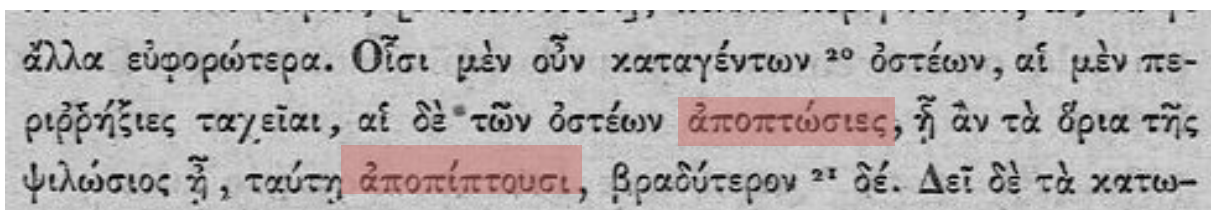


Figure 1 : Extrait de « Des Instruments De Réduction », Chapitre 35, Hippocrate : « Quand la gangrène survient dans une fracture, les chairs se séparent promptement ; quand aux os, ils se détachent là où sont les limites de la dénudation, mais plus lentement. »

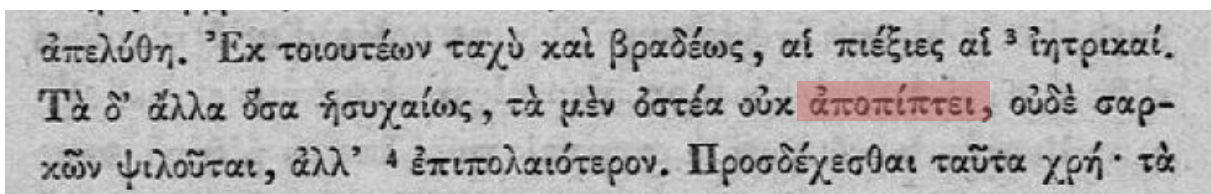


Figure 2 : Extrait de « Des Instruments De Réduction », Chapitre 35, Hippocrate : « Quand la compression n’a pas été forte, les os ne tombent pas morts détachés, ils ne se dénudent pas non plus, mais la gangrène reste plus superficielle. »

Cependant Érotien, au I^{er} siècle de notre ère, emploie « apoptosis » pour parler du relâchement d'un bandage. Le mot apoptose est alors employé pour introduire la notion de distance, séparation que l'on met entre un bandage et une plaie. Par la suite, on trouve le mot « apoptosis » traduit par « chute » dans divers lexiques grecs du XIX^{ème} siècle^{3,4}, eux-mêmes composés sur le Thesaurus linguae Graecae de Henri Estienne datant de 1572 (Figure 3).

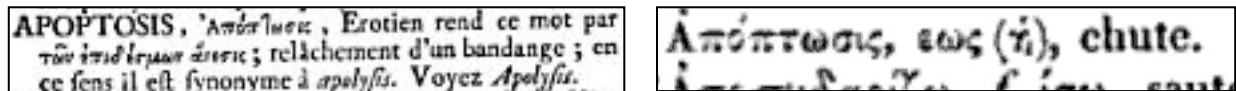


Figure 3 : A gauche extrait du Dictionnaire universel de médecine, de chirurgie, d'anatomie, de chimie, de pharmacie, de botanique, d'histoire naturelle, etc. A droite extrait du Dictionnaire Grec - Français composé sur un nouveau plan.

En langage médico-scientifique moderne, Kerr, Wyllie et Currie introduisent en 1972 le mot apoptosis pour décrire le processus de mort cellulaire actif et contrôlé par la cellule, par opposition à la nécrose qui est un processus dégénératif lié à une rupture de l'homéostasie cellulaire, non contrôlée par un stimulus précis. Les auteurs décrivent alors un processus complémentaire et opposé à la mitose dans la régulation des populations cellulaires animales en général, qui aboutit à la constitution de corps apoptotiques contenant des restes de noyaux, qui seront ensuite phagocytés et dégradés par d'autres cellules (Figure 4). Après concertation avec le Professeur James Cormack du département de grec de l'université d'Aberdeen, les auteurs proposent de nommer ce processus cellulaire apoptose, qu'ils traduisent en anglais par « falling off », en raison de la fragmentation cellulaire en plusieurs corps séparés.

Ce processus avait déjà été rapporté par Virchow⁵ en 1860 mais sous le terme de nécrobiose qu'il avait bien opposé à nécrose, et ceci 20 ans après la première description de mort cellulaire par Vogt⁶.

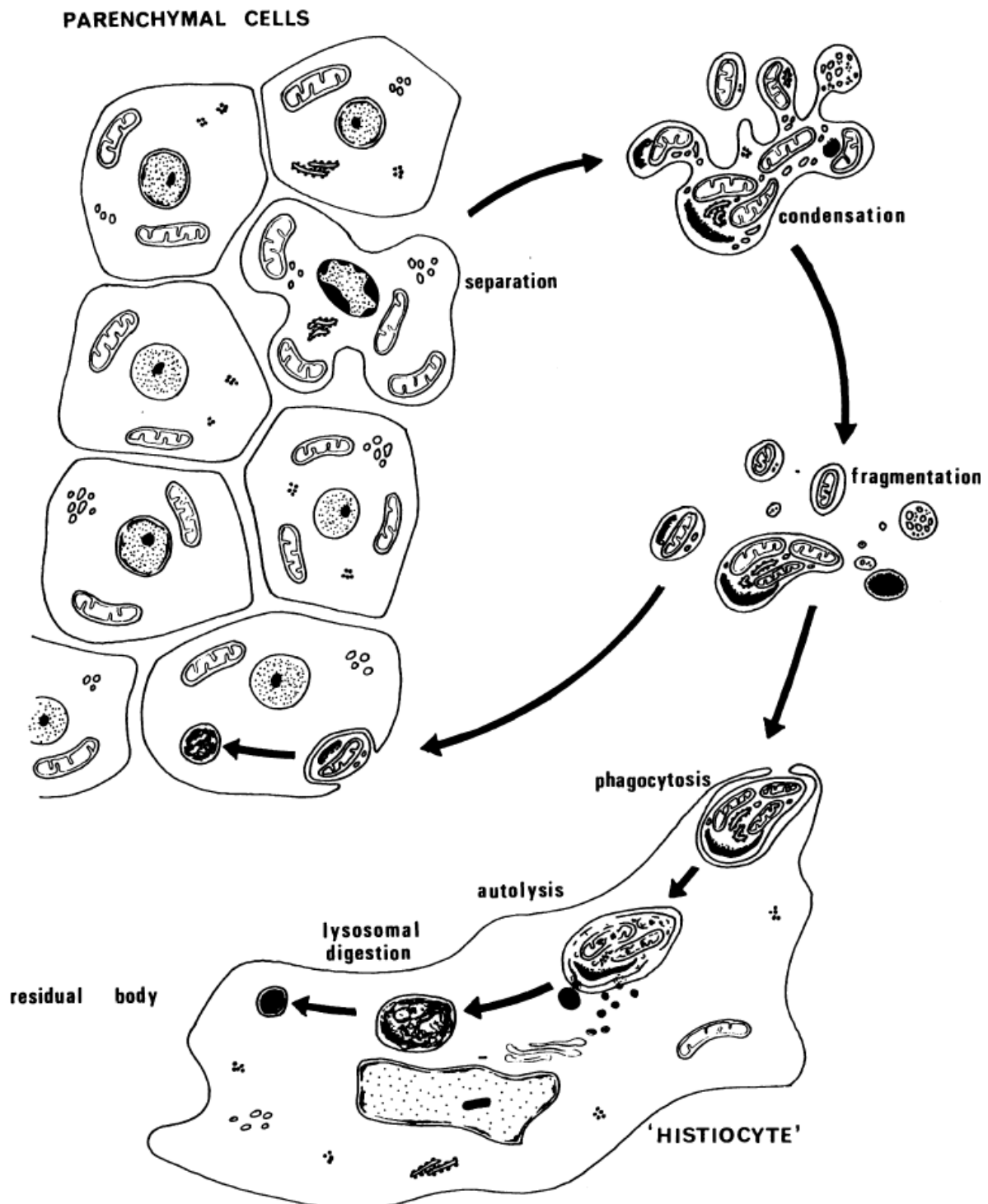


FIG 5 —Diagram to illustrate the morphological features of apoptosis.

Figure 4 : Explications du processus d'apoptose lors de sa première description scientifique dans son acceptation actuelle.

3. Définition et rôles

Nous appelons apoptose la mort cellulaire programmée, c'est à dire l'autodestruction des cellules en réponse à un stimulus. On observe au cours du processus d'apoptose un bourgeonnement de la membrane plasmique, puis le noyau est condensé et fragmenté. L'apoptose aboutit à la formation de plusieurs corps apoptotiques dont la membrane est intègre et dont les organelles fonctionnent toujours, qui seront ensuite détruits ou phagocytés par d'autres cellules environnantes. On oppose l'apoptose à la nécrose, qui est une mort cellulaire causée par des dommages physiques ou chimiques. La nécrose est initiée par l'épuisement total des réserves énergétiques de la cellule, ce qui entraîne une rupture de la membrane cellulaire. La libération du contenu cellulaire dans la matrice extracellulaire active le système immunitaire local et entraîne une inflammation. Dans la nécrose, on n'observe jamais la fragmentation de l'ADN génomique caractéristique de l'apoptose. Un troisième type de mort cellulaire également décrit est l'autophagie, qui consiste en une digestion d'une partie du cytoplasme d'une cellule par ses propres lysosomes.

L'apoptose est un mécanisme indispensable au développement des organismes pluricellulaires et au maintien de leur homéostasie. Chez l'homme, elle permet par exemple lors de l'embryogenèse l'élimination des espaces interdigitaux et la séparation des doigts. Dans les organismes adultes l'apoptose joue un rôle essentiel de régulation de l'homéostasie ; c'est à dire de l'espace dédié à chaque type de tissu et population cellulaire. En ce qui concerne le système immunitaire, en particulier les lymphocytes, garants de nos défenses adaptatives, l'apoptose est un mécanisme clef de son fonctionnement harmonieux. Ainsi lors de la réponse immunologique vis à vis d'un antigène étranger, la phase d'expansion des lymphocytes spécifiques à celui-ci et nécessaires à son élimination est suivie d'une phase de contraction, par mort apoptotique, mettant fin à l'inflammation ainsi générée lorsqu'elle n'est plus utile. Par ailleurs, le développement de lymphocytes dits « auto-réactifs » est également contrôlé, entre autres, par apoptose. Par conséquent, des proliférations cellulaires incontrôlées comme des cancers et des maladies auto-immunes et inflammatoires peuvent survenir lorsque ce processus physiologique est défectueux. Nous détaillerons plus bas les caractéristiques de l'Auto-immune Lymphoproliférative Syndrome (ALPS), un exemple

de pathologie liée à un défaut d'apoptose lymphocytaire. L'apoptose lymphocytaire est déclenchée par des signaux de morts qui entraînent des cascades de signalisation intracellulaires dites extrinsèque lorsque les signaux de mort sont transmis par des récepteurs de surface et intrinsèque lorsque les signaux proviennent de la cellule.

4. Description

a) Voie extrinsèque

La voie extrinsèque de l'apoptose lymphocytaire est déclenchée par la stimulation de récepteurs transmembranaires dits récepteurs de mort (DR), appartenant à la superfamille des récepteurs du TNF (TNFRSF, Figure 5). On dénombre six récepteurs de mort à l'heure actuelle, listés ci-dessous (tableau 1)⁸. Parmi ces récepteurs de mort, CD95, connu sous le nom de FAS, est une protéine essentielle au maintien de l'homéostasie lymphocytaire périphérique chez l'homme. L'ALPS, détaillé plus bas, est déclenché par un défaut de fonction de FAS⁹. Afin de transmettre le signal de mort, FAS, associé à deux autres protéines FAS sous forme homotrimérique¹⁰, doit être stimulé au niveau de son domaine extracellulaire riche en cystéine par son ligand (FAS-LIGAND). Cette stimulation du récepteur par son ligand permet de dévoiler son domaine de mort (DD) intracellulaire. L'interaction du DD de FAS avec celui de FADD permet le recrutement des CASPASES 8 et 10¹¹. FADD, ou MORT1, est une protéine adaptatrice intracellulaire qui en plus du DD possède un domaine effecteur de mort (DED), dévoilé par l'interaction de son DD avec celui de FAS, et qui se lie aux CASPASES 8 et 10¹².

Récepteur	Noms alternatifs	Ligand
TNFR1	TNFRSF1A	TNF, LT α
CD95	TNFRSF6, FAS	CD95L, FAS-LIGAND
DR3	TNFRSF25, TRAMP	TL1A
DR4	TNFRSF10A, TRAILR1	Apo2L, TRAIL
DR5	TNFRSF10B, TRAILR2	Apo2L, TRAIL
DR6	TNFRSF21	?

Tableau 1 : Récepteurs de mort connus

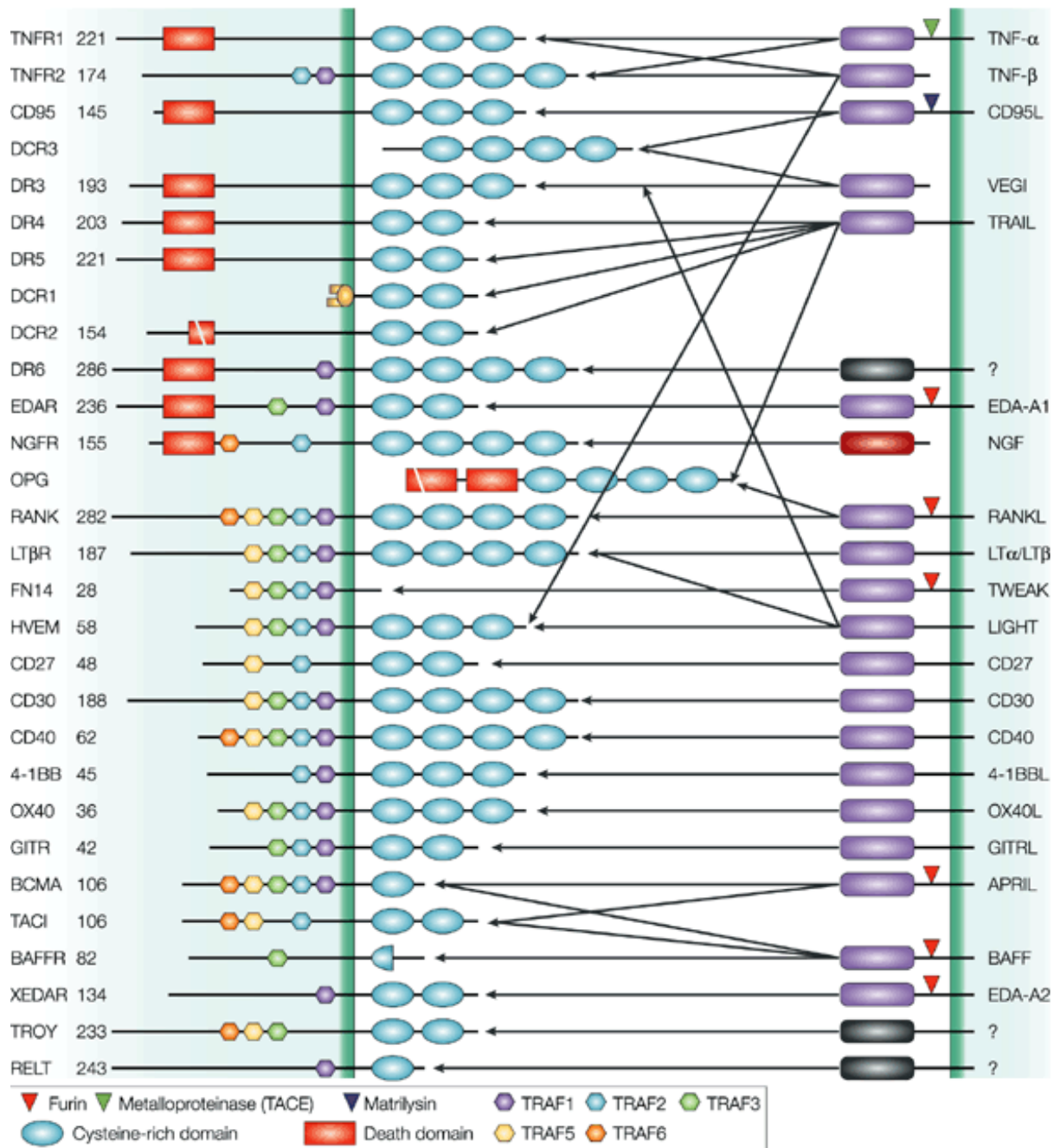


Figure 5 : Représentation schématique des récepteurs et ligands de la superfamille des Tumor Necrosis Factors, d'après Aggarwal BB et Al.¹³

L'ensemble de ces protéines forme le complexe multimoléculaire d'induction de la mort cellulaire, le DISC. Ce complexe clive les deux PRO-CASPASES 8 et 10 dites initiatrices, ce que les active et elles vont à leur tour, dans une boucle d'amplification, activer les CASPASES 3 et 7 effectrices du processus d'apoptose¹⁴.

Depuis 2008, plusieurs études ont décrit la formation d'un deuxième DISC, le DISC II (Figure 6), complémentaire du premier, qui associe FAS à la PRO-CASPASE 8 et à c-FLIP, par leurs DED respectifs, et dont la fonction est également de cliver et activer la CASPASE 8^{15,16}.

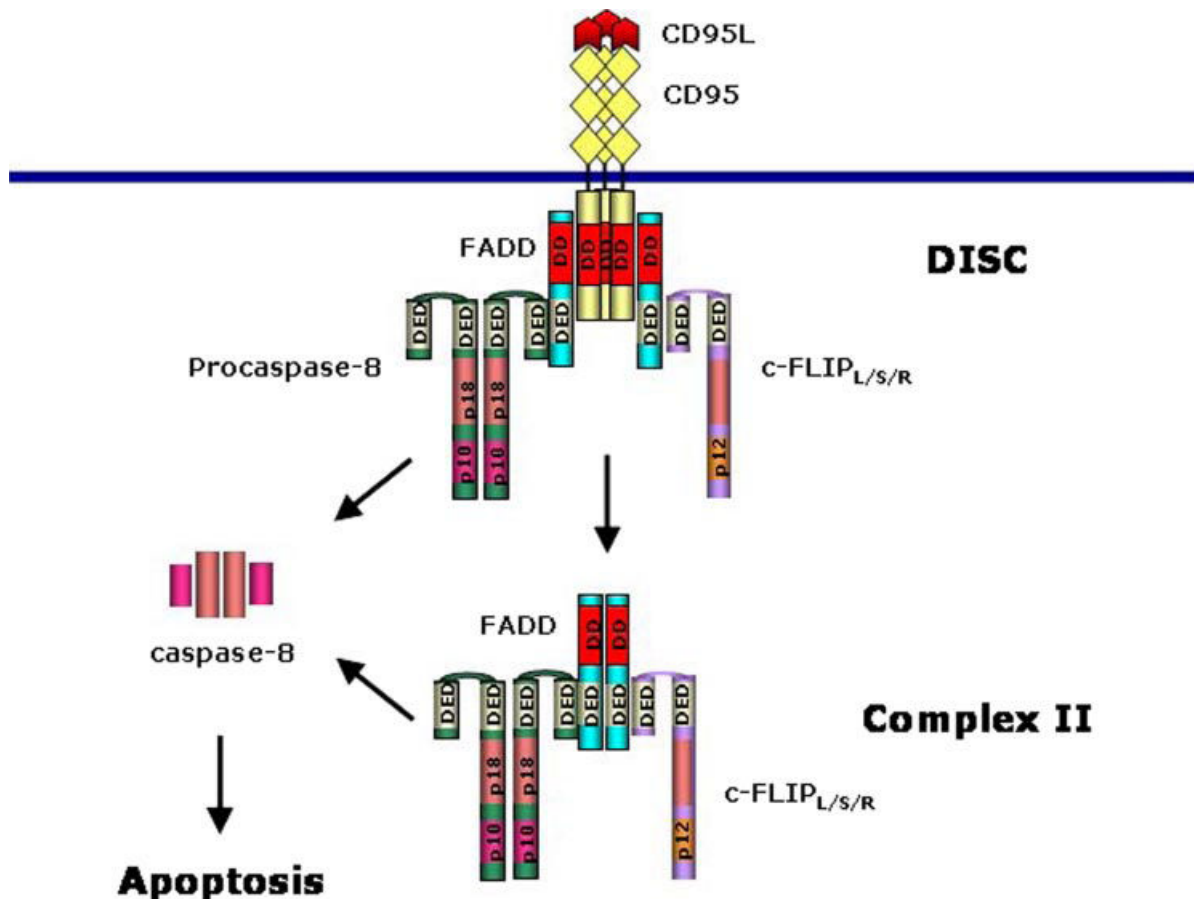
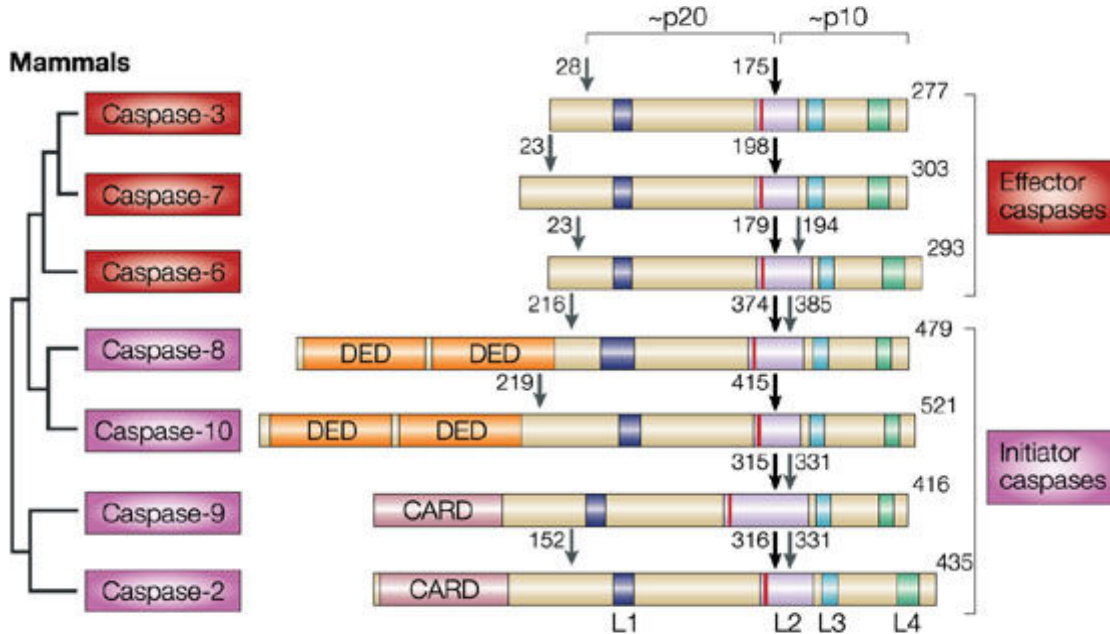


Figure 6 : Représentation schématique de la formation des DISCs après liaison de FAS et de son ligand, d'après Lavrik et Al.¹⁵

Les caspases, pour Cystein ASPartyl proteASE, sont des endoprotéases qui possèdent un site catalytique, dont un résidu cystéine compris dans une séquence amino-acidique de type Q-A-C-R/Q/G-G (Figure 7)¹⁷. La synthèse des caspases aboutit à la formation de pro-caspases, qui sont des zymogènes dont l'activation a lieu après un clivage protéolytique. Les caspases actives sont des tétramères constituées de deux grandes et deux petites sous-unités. Elles clivent des substrats contenant un motif tétra peptidique finissant par un aspartate. Elles-mêmes contiennent ce motif, qui permet la mise en place d'une boucle d'amplification qui consiste au clivage des caspases par les caspases. Les CASPASES initiatrices 8 et 10 possèdent un DED leur permettant de se lier

aux protéines du DISC, alors que la CASPASE 9 possède un domaine CARD, lui permettant de se lier aux protéines de l'apoptosome (Cf voie intrinsèque). Les caspases effectrices, elles, n'ont ni domaine CARD ni domaine DED (Figure 7).

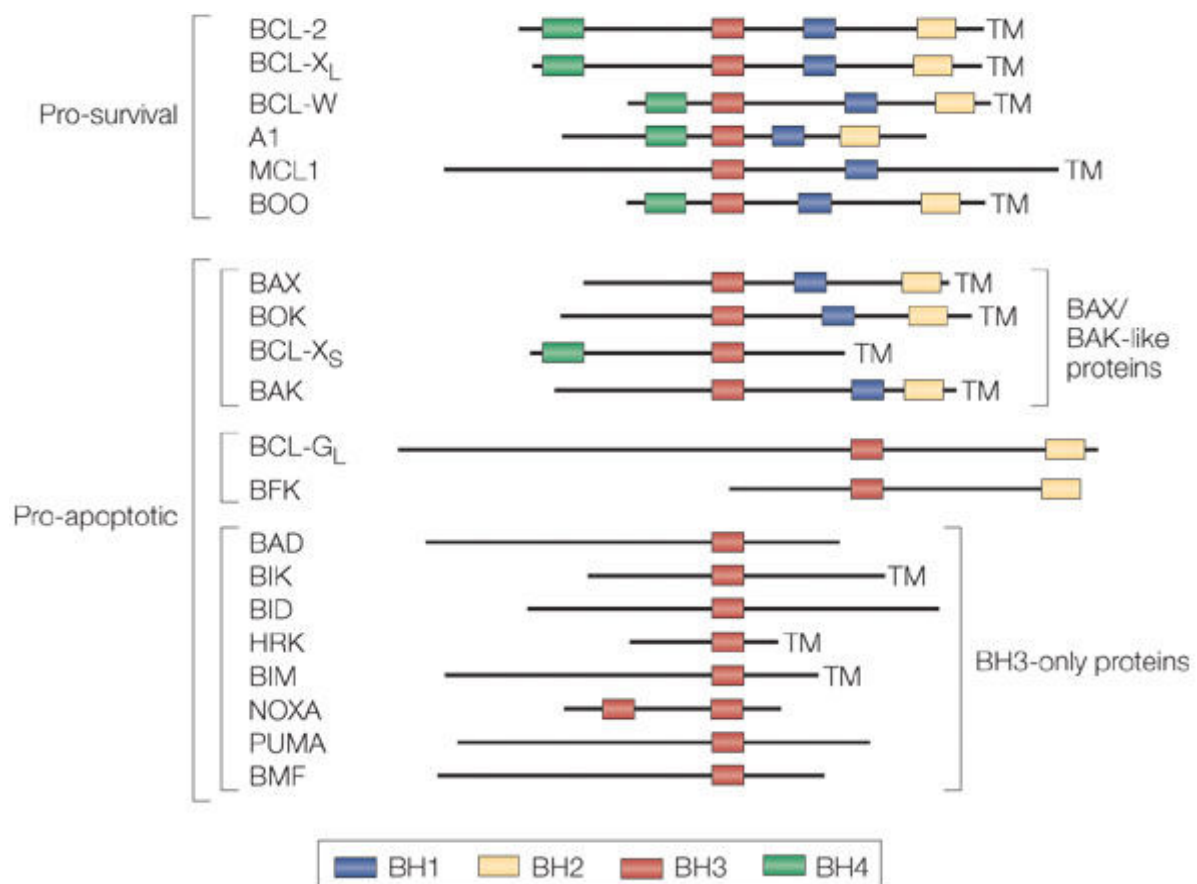


b) Voie intrinsèque

La voie intrinsèque de l'apoptose lymphocytaire est déclenchée par des agressions physiques ou chimiques subies par les cellules, comme des radiations, l'exposition à des drogues etc. Quel que soit le stimulus, cette voie est dépendante des protéines de la famille de BCL-2, qui ont soit une fonction inductrice soit une fonction inhibitrice (Tableau 2, Figure 8)¹⁸. BCL-2 est une protéine décrite initialement comme associée au lymphome folliculaire, dans lesquels la translocation chromosomique t(14,18) entraîne sa sur-expression, son nom entier étant B-Cell Lymphoma 2¹⁹. Les protéines de cette famille partagent un ou des domaines d'homologie à BCL-2 dits BH. Elles ont toutes une action sur la mitochondrie qui est le point d'orgue de cette voie intrinsèque de l'apoptose. Certaines stabilisent la partie externe de la membrane mitochondriale (gardiennes), d'autres y créent des canaux permettant au calcium d'en sortir (effectrices), et d'autres régulent la fonction des premières (initiatrices).

Initiatrices	Gardiennes	Effectrices
1 Domaine BH3	Domaines BH1 BH2 BH3 BH4	Domaines BH1 BH2 BH3
BIM, BID, BAD, PUMA, BIK, BMF, NOXA, HRK	BCL-2, BCL-XL, BCL-W, MCL1, A1, BCL-B	BAK, BAX, BOK
Inhibent l'action des gardiennes	Stabilisent la membrane mitochondriale, inhibent les effectrices	Forment le canal mitochondrial nécessaire à l'induction de l'apoptose

Tableau 2 : Protéines de la famille de BCL-2

Figure 8 : Représentation schématiques des protéines de la famille de BCL-2 d'après Strasser.¹⁸

Une fois le stimulus perçu par la cellule, le signal, pouvant être transmis de multiples façons, par exemple par des protéines kinases (JNK, ERK, AKT...), les protéines initiatrices permettent la levée de l'inhibition des protéines effectrices BAX et BAK. BAX et BAK forment alors un canal ionique dans la membrane externe de la mitochondrie, le MAC²⁰. Ce canal permet à la mitochondrie de relâcher le CYTOCHROME C, une petite hémoprotéine soluble normalement associée à sa membrane interne, dans le cytosol²¹.

Le CYTOCHROME C ainsi libéré dans le cytoplasme va former un complexe multimoléculaire avec deux APAF1 et deux PRO-CASPASE 9, appelé apoptosome. APAF1, pour Apoptotic Peptidase Activating Factor 1, est une protéine présente dans le cytosol qui est maintenue repliée et donc inactive²². Lors de la fixation du CYTOCHROME C sur APAF1, celle-ci dévoile un domaine CARD, pour Caspase Recruitment Domain, qui permet à plusieurs APAF1 de s'associer, et la fixation de la PRO-CASPASE 9, une autre caspase initiateurice qui contrairement aux CASPASES 8 et 10 ne contient pas de domaine DED, mais un domaine CARD. L'apoptosome ainsi formé induit l'activation de la CASPASE 9 qui à son tour active les caspases effectrices ; CASPASE 3 et CASPASE 7²³.

L'apoptose lymphocytaire intrinsèque peut aussi être déclenchée par l'élimination de l'Interleukine 2 (IL2) du milieu environnant du lymphocyte à la fin de la réaction immunitaire. C'est alors BIM, (famille de BCL-2) qui déclenche le phénomène²⁴. Lors de l'activation de la voie extrinsèque, il y a également une activation de la voie intrinsèque par le DISC qui en plus de cliver et activer les caspases initiateurices clive BID²⁵ (famille de BCL-2). BID peut aussi être clivé par le GRANZYME B²⁶.

c) Les caspases effectrices et leurs cibles

Les deux voies; extrinsèque et intrinsèque, aboutissent au clivage et à l'activation massive- grâce aux boucles d'amplification - des CASPASES 3 et 7, dites effectrices, qui peuvent également être activées par les granzymes, bien que plus rarement. Les caspases effectrices ne contiennent pas de domaines DED ou CARD, et sont constituées de deux sous-unités ; une grande et une petite (Figure 7).

Parmi les substrats des caspases effectrices dont le clivage aura un effet pro apoptotique, les protéines de la famille PARP, pour Poly ADP Ribose Polymérase, ont été identifiées de longue date comme cibles caractéristiques des caspases effectrices lors de l'apoptose lymphocytaire²⁷.

Les protéines de la famille de PARP sont composées de quatre domaines ; un domaine de liaison à l'ADN, un domaine site de clivage par les caspases, un domaine

d'auto-modification, et un domaine catalytique. On les trouve dans le noyau, leur fonction étant de participer au processus de réparation de l'ADN. Lorsqu'une protéine PARP est rendue inactive par le clivage induit par une caspase, son activité de réparation de l'ADN est alors affectée.

Cependant il semblerait que le rôle du clivage de PARP dans l'apoptose lymphocytaire soit plus lié à un contrôle de la dépense énergétique qu'à l'absence de maintien de l'intégrité de l'ADN. L'inactivation par le clivage de PARP induirait un inversement de la balance de dépense énergétique en faveur de l'induction de l'apoptose et en défaveur de celle requise pour la réparation de l'ADN. En effet, la protéine PARP active permet le transfert d'ADP-riboses vers les protéines ayant un site accepteur et cette ribosylation consomme l'équivalent de quatre molécules d'ATP²⁸. Ainsi, en présence d'un stimulus de mort mais si PARP reste active – non clivée –, la cellule consomme trop d'ATP pour avoir des réserves suffisantes à accomplir le processus d'apoptose et meurt par nécrose et non plus par apoptose²⁹.

Une cible des caspases effectrices identifiée comme principale responsable de la fragmentation de l'ADN génomique, caractéristique de l'apoptose, est l'inhibiteur des CAD (Caspase Activated DNase) : ICAD. Son clivage libère les CAD, des endonucléases qui migrent dans le noyau et digèrent l'ADN entre les nucléosomes, ce qui aboutit à la fragmentation de l'ADN génomique en morceaux de la taille de multiples de 180 paires de bases³⁰.

Nombre d'autres protéines sont des cibles des caspases effectrices ayant un rôle dans le processus d'apoptose. Nous citerons la protéine ROCK1 (Rho-associated coiled-coil containing protein kinase 1), régulatrice de l'organisation du cytosquelette³¹; l'actine, la gelsoline, et les laminines nucléaires, nécessaires au maintien de l'architecture de la cellule. La protéolyse de ces cibles joue un rôle essentiel au processus de séparation de la cellule en plusieurs corps apoptotiques (blebbing). D'autres cibles des caspases effectrices sont des régulateurs de l'apoptose de la famille de BCL-2, et des protéines inhibitrices de l'apoptose.

d) *L'apoptose indépendante des caspases*

L'Apoptosis inducing factor (AIF) est une flavoprotéine localisée en conditions physiologiques à la membrane interne de la mitochondrie où elle a un rôle de NADH oxydase nécessaire à la phosphorylation oxydative normale et au maintien de l'intégrité mitochondriale^{32,33}. Divers mécanismes indépendants du clivage des caspases – ce processus n'est pas inhibé par l'adjonction de ZVAD, inhibiteur des caspases - peuvent entraîner son relargage dans le cytosol suite à sa protéolyse³⁴. L'AIF entre ensuite dans le noyau pour se lier directement à l'ADN et exécuter l'apoptose^{35,36}. L'endonuclease G (EndoG) est également une protéine mitochondriale intervenant dans la fragmentation de l'ADN nucléaire de façon indépendante des caspases³⁷.

La signalisation par les récepteurs de mort FAS, TRAILR ou par le TNFR peut entraîner cette apoptose indépendante des caspases, par l'intermédiaire de l'activité kinase de RIP³⁸⁻⁴⁰. Les protéines RIP, pour Receptor Interacting Proteins, sont des sérine/thréonine kinases possédant un DD et ainsi capables d'interagir avec d'autres protéines à DD. C'est l'interaction entre le récepteur de mort, la protéine adaptatrice à DD TRADD et RIP qui induit le signal de mort indépendant des caspases. Cependant, RIP a également des effets anti-apoptotiques car l'interaction de son domaine intermédiaire et de son domaine kinase avec le récepteur de mort et TRAF2 lui confère la possibilité d'activer NF- κ B⁴¹. Il est à noter que cette interaction peut aussi activer la voie de JNK, mais dans ce cas les effets sur l'apoptose des lymphocytes restent controversés^{42,43}.

L'adjonction de drogues ou stress peut aussi entraîner une apoptose indépendante des caspases, dépendante de BIM et BAK comme cela a été démontré en particulier dans plusieurs lignées cancéreuses⁴⁴⁻⁴⁶.

L'apoptose caspase indépendante peut enfin être déclenchée par l'activation des cathepsines ou des calpaïnes^{47,48}.

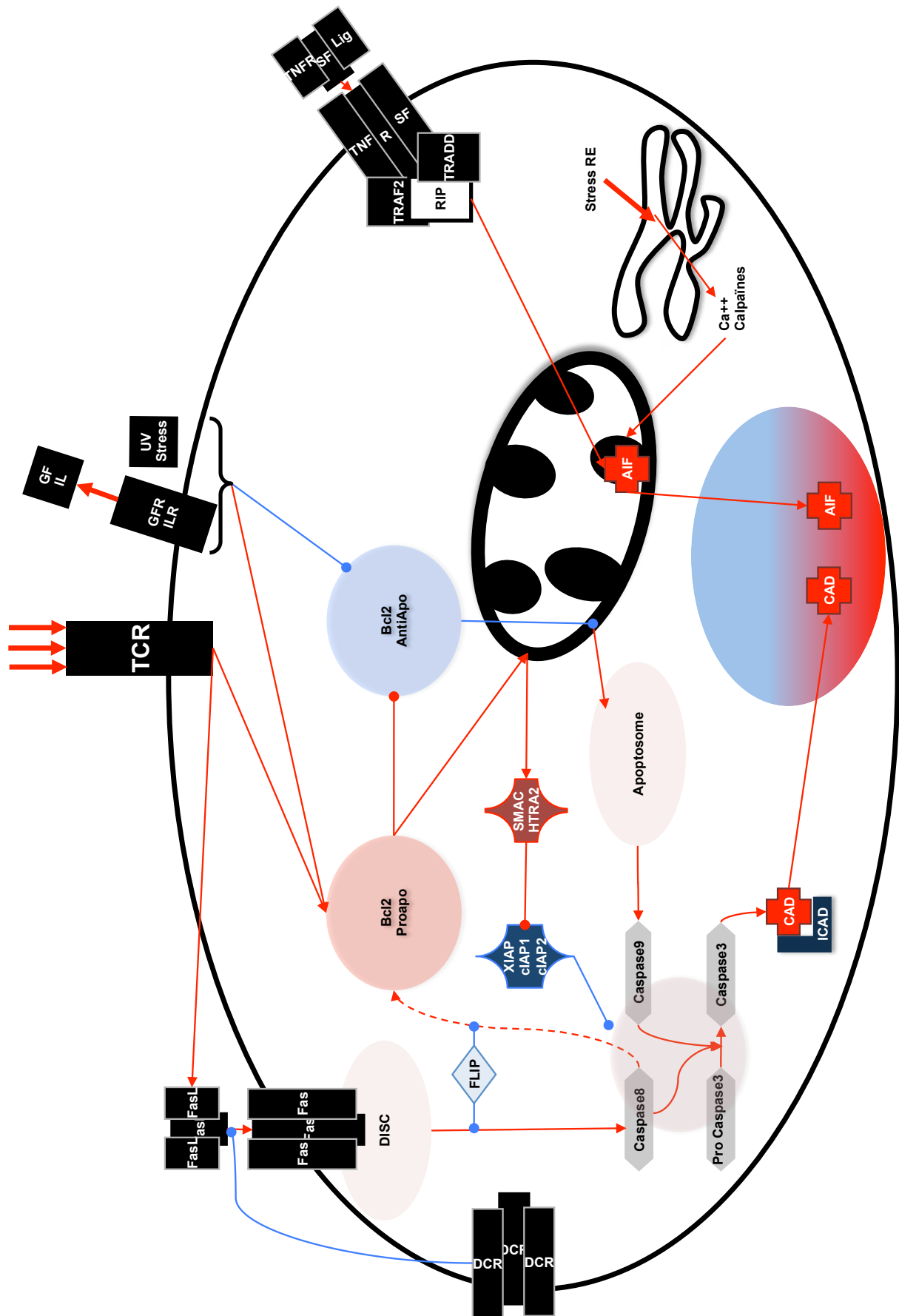


Figure 9 : Représentation schématique des voies extrinsèque et intrinsèque de l'apoptose lymphocytaire T

5. Régulation de l'apoptose

a) Transmission du signal : les decoy receptors

Certaines protéines membranaires de la superfamille des TNF récepteurs ne possèdent pas de domaine de mort alors qu'elles sont à même de se lier aux ligands des récepteurs de mort. Ces récepteurs leurres, appelés decoy receptors, ont la capacité d'inhiber la transmission du signal apoptotique extrinsèque. Par ailleurs, OPG est un récepteur soluble, possédant des domaines de mort mais sans partie intracellulaire à même de transmettre le signal (Figure 5).

b) Modifications post-traductionnelles de FAS

La signalisation engendrée par la stimulation de FAS est dépendante de la localisation de la protéine aux radeaux lipidiques, des microenvironnements à la surface des cellules facilitant les interactions entre protéines et la transduction des signaux⁴⁹, et de son internalisation⁵⁰, qui en résulte. Or, ce sont des modifications post-traductionnelles de FAS dont découlent ces événements.

La palmitoylation de FAS au niveau de son domaine intracellulaire proche de la membrane cytoplasmique est un événement clef déterminant son adressage aux radeaux lipidiques membranaires⁵¹ et le recrutement de la protéine EZRINE qui permet de lier FAS au cytosquelette d'actine⁵². Ce n'est qu'après l'internalisation de FAS suite à ce recrutement de l'EZRINE que le récepteur de mort peut transmettre son signal⁵³. Par ailleurs, l'endocytose de FAS est également dépendante de la CLATHRINE et leur interaction dépend d'un motif de liaison aux glyco-sphingolipides situé sur la partie extracellulaire de FAS⁵⁴.

Ainsi, il a été démontré que la liaison de FASLIGAND et de FAS non suivie de l'internalisation de cette dernière aboutit à l'activation de signaux de prolifération (ERK, NF-kB) au lieu d'entraîner l'apoptose de la cellule concernée⁵⁰.

c) *Inhibition du DISC : FLIP*

FLIP (FLICE inhibitory protein) est une protéine régulatrice intracellulaire qui possède deux DED, qui lui permettent d'être en interaction rapprochée avec FADD et les CASPASES 8 et 10 dans le DISC. Présente en grandes quantités, FLIP inhibe l'activation du DISC^{55,56}. La régulation négative de FLIP est une étape essentielle à la sensibilisation des lymphocytes à la voie extrinsèque de l'apoptose. Comme nous l'avons cependant vu plus haut, il a été démontré à plusieurs reprises qu'une expression moins importante de FLIP peut avoir des effets pro-apoptotiques^{55,57}, par la formation d'un DISC II^{15,16}.

d) *Inhibition de la voie mitochondriale :*

(1) Heat Shock Proteins

Les protéines du choc thermique dites Heat Shock Proteins, HSP, sont des protéines chaperonnes dont l'expression est induite dans de nombreux types cellulaires par le stress. Cette famille de protéines est connue pour son implication dans la protection de l'intégrité cellulaire. Parmi ces protéines, HSP27, HSP70 et HSP90, nommées d'après leurs masses moléculaires, ont des effets anti-apoptotiques⁵⁸.

HSP90 et HSP70 sont ATP dépendantes. En se liant à l'ATP et en l'hydrolysant elles changent de conformation et perdent leur rôle protecteur pour les protéines précédemment protégées, qui peuvent alors être ubiquitinées et dégradées par le protéasome.

Ainsi, le changement de conformation de HSP90 a une influence sur l'apoptose de plusieurs façons. D'une part, elle assure la stabilité de BCL-2 qui inhibe le relargage du cytochrome c par la mitochondrie⁵⁹. D'autre part, elle se lie à APAF empêchant ainsi la formation de l'apoptosome⁶⁰. De plus, HSP90 protège AKT de la déphosphorylation, lui permettant ainsi de conserver sa fonction kinase et donc son rôle de phosphorylation inhibitrice de BAD et CASPASE 9^{61,62}.

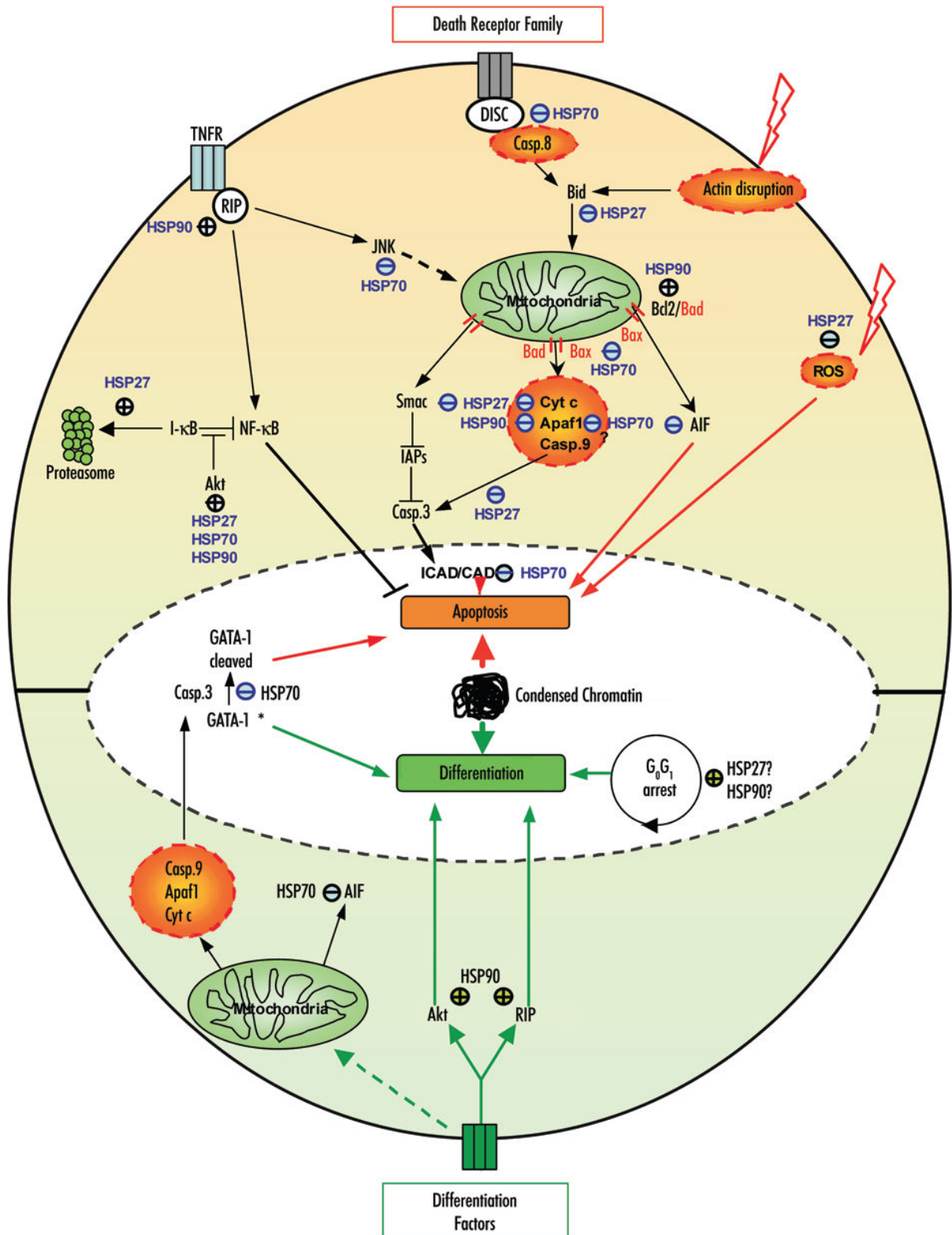


Figure 10 : Inhibition de l'apoptose par les protéines HSP, d'après Lanneau et Al.⁵⁸

AKT phosphorylée phosphoryle à son tour l'I κ B kinase, libérant ainsi le NF- κ B qui a une action anti-apoptotique⁶³. Enfin, HSP90 a un rôle de chaperonne pour RIP⁶⁴ et favorise son rôle activateur de la voie NF- κ B, inhibant par là encore l'apoptose.

HSP70 agit également à plusieurs niveaux ; elle se lie à JNK1 et bloque son activité kinase l'empêchant ainsi de déclencher l'apoptose intrinsèque⁶⁵. Elle inhibe la translocation et l'insertion de BAX à la membrane mitochondriale⁶⁶. Elle se lie aussi à APAF, empêchant la formation de l'apoptosome⁶⁷. HSP70 n'intervient pas que dans l'inhibition de la voie intrinsèque ; elle agit au niveau de CAD, l'empêchant de digérer l'ADN nucléaire⁶⁸, au niveau des récepteurs de mort DR4 et DR5 empêchant la transmission du signal via le DISC⁶⁹, et inhibe également l'apoptose indépendante des caspases en se liant à AIF⁷⁰.

HSP27 n'est pas ATP dépendante. Son activité de chaperonne est régulée positivement par son degré d'homo-multimérisation. Elle interagit avec le CYTOCHROME C, bloquant la formation de l'apoptosome⁷¹. HSP27 régule et stabilise la dynamique du réseau de microfilaments d'actine, empêchant la redistribution de BID et le déclenchement de l'apoptose intrinsèque⁷². HSP27 interagit avec SMAC, troublant son action inhibitrice des protéines inhibitrices des caspases⁷³. Enfin, elle aurait comme HSP90 une interaction avec AKT, et une action sur le NF- κ B par ce biais⁷⁴.

(2) Membres anti-apoptotiques de la famille BCL-2

Nous avons cité plus haut les protéines à action anti-apoptotique de la famille de BCL-2. Situées au niveau de la membrane externe de la mitochondrie, elles stabilisent cette membrane empêchant ainsi la formation du MAC et le relargage du CYTOCHROME C vers le cytosol (Tableau 2 et Figure 8).

e) Inhibition et régulation des caspases :

(1) Inhibitory Apoptosis Proteins

Les IAP pour inhibitory apoptosis proteins (Tableau 3) sont caractérisées par le fait qu'elles contiennent un ou plusieurs domaines BIR (Baculoviral IAP repeat) de 70-80 acides aminés. Ces domaines sont riches en cystéine et histidine, chélateurs du zinc et forment une structure globuleuse compacte. Il existe deux types de domaines BIR, contenant ou non une poche de liaison peptidique, leur conférant la possibilité de se lier à différents partenaires. La plupart des IAP contiennent également un domaine RING et ainsi une activité ubiquitine ligase E3. (Figure 11)

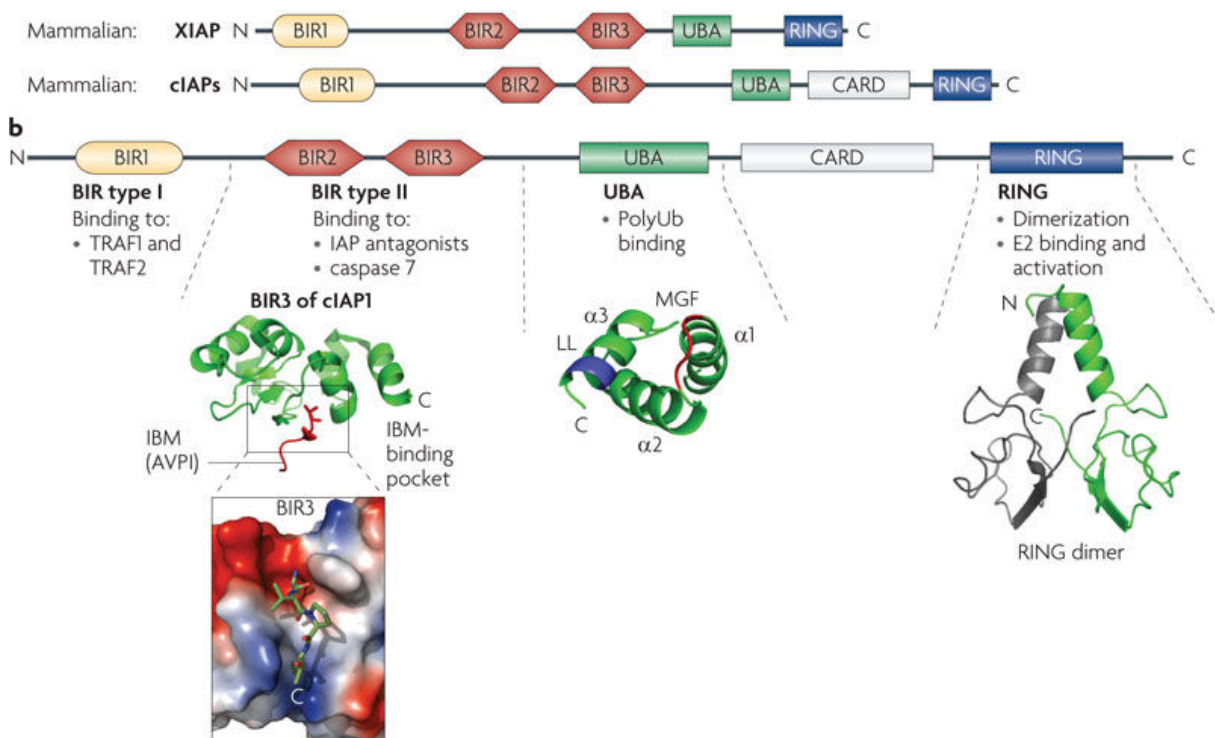


Figure 11 : Représentation schématique des IAPs, d'après Gyrd-Hansen et Meier.⁷⁵

Les IAP sont des inhibiteurs endogènes des caspases grâce à leurs domaines BIR, XIAP étant la mieux caractérisée et celle dont les effets anti-apoptotiques pour les lymphocytes T sont les mieux mis en évidence⁷⁶. Elles participent également à la régulation du cycle cellulaire et à la modulation de la transduction du signal par les récepteurs de surface. Les cIAP1 et 2, en plus d'inhiber les CASPASES 3, 7 et 9⁷⁷,

participent à l'ubiquitination de RIP par l'intermédiaire de leur activité ligase E3. RIP recrute alors l'inhibiteur du NF- κ B (Cf supra) ce qui aboutit à l'activation de NF- κ B^{78,79}. Les IAPs sont ainsi essentielles à l'activation de NF- κ B induite par le TNF α ⁸⁰. Réciproquement, la voie du NF- κ B est également impliquée dans la régulation de la transcription des IAPs⁸¹⁻⁸³. Enfin, les protéines SMAC et HTRA2 participent à la régulation des IAPs.

IAP	Noms alternatifs	Domaines	Caspases cibles	Interactions avec
NAIP	BIRC1	BIR(3) NOD LRR	Caspases 3-7	Hippocalcin
XIAP	BIRC4 API3 MIHA ILP1	BIR(3) RING	Caspases 3-7-9	SMAC HTRA2 XAF1 TAB1 NRAGE
c-IAP1	BIRC2 API1 MIHB HIAP2	BIR(3) CARD RING	Caspases 3-7-9	SMAC HTRA2 TRAF1 TRAF2
c-IAP2	BIRC3 API2 MIHC HIAP2	BIR(3) CARD RING	Caspases 3-7-9	SMAC HTRA2 TRAF1 TRAF2 BCL10
Survivin	BIRC5 API4	BIR Coiled-coil	Caspases 3-7	SMAC B-tubuline
Livin	BIRC7 KIAP ML-IAP	BIR RING	Caspases 3-7-9	SMAC
Ts-IAP	BIRC8 ILP2	BIR RING	Caspase 9	

Tableau 3 : Nomenclature, domaines, cibles et interactions des IAP

(2) SMAC et HTRA2

SMAC pour Second Mitochondrial Activator of Caspases, est une petite protéine localisée dans l'espace inter-membranaire de la mitochondrie. Lors de l'apoptose médiée par la voie intrinsèque, SMAC est relarguée dans le cytosol avec le CYTOCHROME C, se lie aux IAP et entraîne leur dégradation par le protéasome, empêchant ainsi l'inhibition des caspases⁸⁴.

HTRA2 est une sérine protéase, également relâchée par la mitochondrie dans le cytosol lors du stimulus pro-apoptotique. Elle clive les IAPs auxquelles elle se lie par l'intermédiaire de son domaine N-terminal⁸⁵.

f) Les facteurs de transcription

De nombreux facteurs de transcription sont impliqués dans le contrôle de l'expression des protéines impliquées dans le processus d'apoptose. Leur action est régulée par l'action de protéines activatrices elles-mêmes dépendantes de signaux provenant de la cellule ou du milieu extra cellulaire, responsables du déclenchement de leurs voies de signalisation.

Ne pouvant être exhaustifs en la matière, nous citerons ci-après les principaux facteurs de transcription impliqués dans le contrôle de l'apoptose, avec une emphase sur les rôles qui leur ont été expérimentalement attribués au sein de la lignée lymphocytaire T.

(1) *NF-κB*

Le nuclear factor kappa B (NF-κB) est un facteur de transcription clef dans la régulation de la prolifération, de la survie et de l'apoptose lymphocytaire T en réponse à la stimulation antigénique. Lorsque celle-ci a lieu, la protéine adaptatrice CARMA1 est recrutée, au niveau du TCR⁸⁶, phosphorylée par la protéine kinase C thêta (PKCθ) dont l'activation a été déclenchée par la stimulation du TCR et peut ainsi interagir avec BCL10 par son domaine CARD⁸⁷, ce qui permet le recrutement de la protéine adaptatrice MALT1⁸⁸. Le complexe formé permet l'oligomérisation de TRAF6 dont l'activité ubiquitine-ligase est ainsi activée⁸⁹. TRAF6 va alors conduire à la poly-ubiquitination d'IKKγ et induire l'activation de IKK, ce qui va avoir pour conséquence la phosphorylation, l'ubiquitination puis la dégradation de l'inhibiteur de NF-κB IκB, libérant le NF-κB, qui peut alors migrer dans le noyau pour se lier aux régions promotrices de ses gènes cibles⁹⁰. (Figure 12)

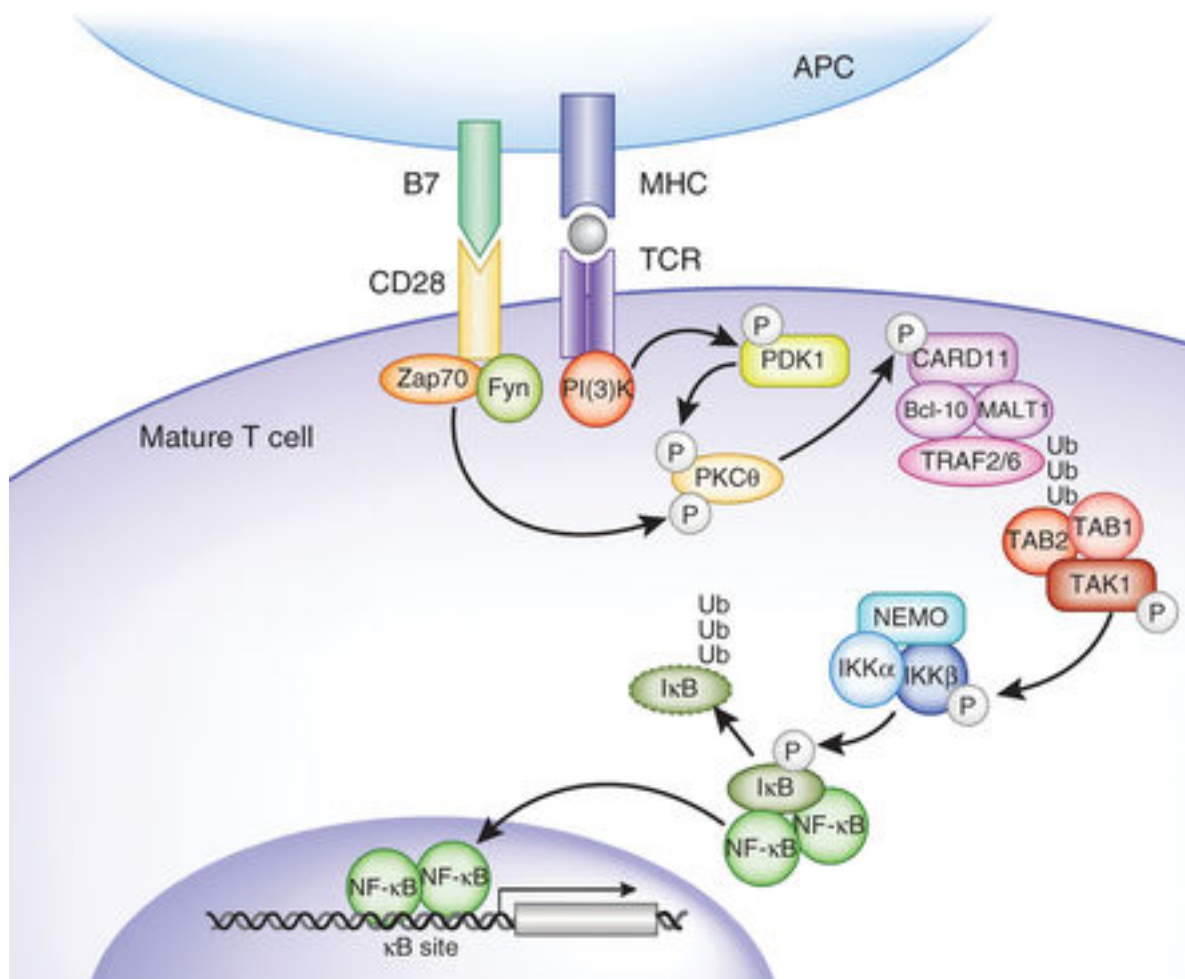


Figure 12 : Représentation schématique de l'activation de NF-κB lors de la stimulation du TCR d'un lymphocyte T mature, d'après Gerondakis et Al.⁹¹

Lors de la stimulation du TCR, l'activation de la PLCγ va entraîner la création de DAG et d'IP3 et l'activation de NF-κB⁹² parallèlement à celle induite par TRAF6.

Le NF-κB peut aussi être libéré de son inhibiteur par la signalisation via les récepteurs de mort, par l'intermédiaire de RIP⁴¹ et des cIAPs⁹³, comme nous l'avons vu plus haut. Enfin, le NF-κB peut être activé par FLIP, que ce soit en interagissant avec RIP et TRAF2⁹⁴, ou indépendamment de la signalisation via les récepteurs de mort. C'est la génération de p22 FLIP (son fragment N terminal) suite à l'hétéro-dimérisation avec la PRO-CASPASE 8 qui permet la levée de l'inhibition de NF-κB⁹⁵.

Les protéines cibles de NF- κ B impliquées dans l'apoptose sont BCL-2, BCL-XL⁹⁶, cIAP1, cIAP2 et XIAP⁸¹⁻⁸³. Une suppression de l'action de NF- κ B est donc essentielle au bon déroulement de l'apoptose lymphocytaire.

Il est à noter que la PKC θ en plus de son action activatrice du NF- κ B peut directement inhiber l'apoptose mitochondriale par la phosphorylation de BAD provoquant ainsi son inactivation^{97,98}.

(2) *AP-1*

La famille des facteurs de transcription AP-1 comprend les protéines JUN, FOS, MAF et ATF. Au sein de ce groupe, cJUN a la plus grande capacité d'activation de la transcription⁹⁹, et est antagonisé dans une certaine mesure par JUNB¹⁰⁰. cJUN est activé par les MAPK/JNK suite à la stimulation des TNFRSF et des récepteurs cytokiniques mais surtout secondairement à un stress comme l'irradiation^{101,102}. cJUN peut également être activé par la voie MAPK/ERK lors de la stimulation par les facteurs de croissance, et par le TCR, de façon similaire à NF- κ B mais la kinase TAK1 est dans ce cas un acteur essentiel¹⁰³.

Dans la lignée lymphoïde, l'apoptose induite par le sevrage en cytokines est précédée d'une augmentation de l'expression des gènes *AP-1*¹⁰⁴. Une cible bien établie de cJUN est FAS-LIGAND, dont l'augmentation a été prouvée au sein de diverses lignées¹⁰⁵. Cependant, des effets anti-apoptotiques de cJUN ont également été décrits, et son rôle dans l'apoptose est complexe et variable selon le stimulus et le type cellulaire¹⁰⁶.

(3) *FoxOs*

Les facteurs de transcription de la famille Forkhead box O - FoxO - sont soumis à l'influence de la kinase AKT, elle-même dépendante de la PI3 kinase¹⁰⁷. Cette voie peut être déclenchée de diverses façons, en particulier par l'intermédiaire des récepteurs des cytokines et facteurs de croissance. Elle aboutit à l'inactivation par AKT de FoxO¹⁰⁸. Les

FoxOs ont été impliqués dans la régulation positive de TRAIL (cancer prostatique¹⁰⁹), de FAS-LIGAND (fibroblastes¹¹⁰) et de protéines pro-apoptotiques de la famille de BCL-2, en particulier BIM et PUMA (lymphocytes T murins¹¹¹⁻¹¹³). Ainsi, les FoxOs sont des suppresseurs de tumeurs et AKT en les inhibant a une action anti-apoptotique.

(4) P53

P53 est un suppresseur de tumeur dont l'activité est initiée en réponse à des endommagements de l'ADN et autres stress perçus par la cellule tels que l'hypoxie, le stress oxydatif. Nous verrons plus bas que la régulation de son activité dépend grandement de l'ubiquitine ligase MDM2. Bien que P53 ait une action également indépendante de son activité de facteur de transcription sur l'apoptose, la plus grande partie de son influence sur l'apoptose est liée à sa capacité à se lier aux régions promotrices des gènes impliqués dans l'apoptose.

Ainsi, P53 induit l'expression de PUMA, NOXA et BAX dans la lignée T humaine¹¹⁴⁻¹¹⁷. Dans des lignées cancéreuses ou de fibroblastes embryonnaires murins, P53 induit également l'expression de BID, FAS, DR5, APAF1 et CASPASE 9¹¹⁸⁻¹²¹.

A l'opposé, l'activité de P53 dépend de celle de FADD. Ainsi, il a été démontré qu'un mutant de FADD ayant un effet dominant négatif introduit dans des fibroblastes ou lymphocytes T induit une inhibition de la prolifération via P53¹²².

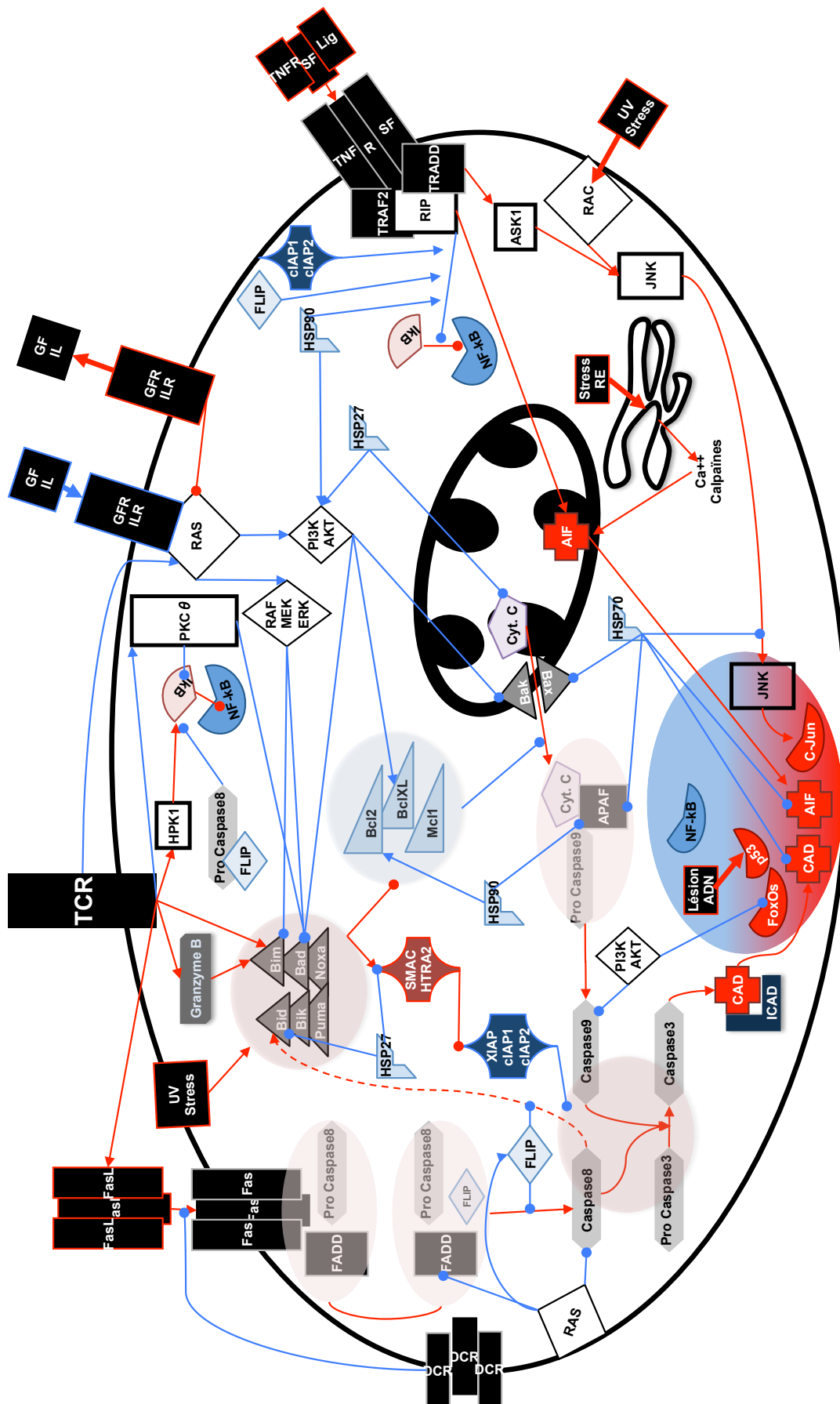


Figure 13 : Représentation détaillée de la régulation de l'apoptose lymphocytaire T. Rouge : signaux pro-apoptotiques, bleu : signaux anti-apoptotiques, flèches pointues : stimulation, flèches à bout rond : inhibition.

B. APOPTOSE ET REPONSE IMMUNITAIRE T

1. Réponse immunitaire T

La réponse immunitaire Tab est initiée par la présentation d'un antigène aux lymphocytes T dont le TCR (T Cell Receptor) est spécifique de cet antigène. La présentation de l'antigène aux lymphocytes T est faite par l'intermédiaire de cellules présentatrices de l'antigène (CPA), pouvant être des cellules dendritiques pour les lymphocytes T naïfs et des monocytes, macrophages, ou des lymphocytes B pour les lymphocytes T mémoires. Les CPA présentent l'antigène lié à une molécule du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) reconnu par le TCR. Celui-ci est constitué de chaînes α et β liées à un complexe CD3 possédant des motifs ITAM dans sa partie intracellulaire. Les motifs ITAM (Immunoreceptor Tyrosine based Activation Motif) sont constitués de 14 à 16 acides aminés et permettent la transduction du signal par l'activation des protéines tyrosine-kinases de la famille SRC : LCK et FYN¹²³. Pour que l'activation de ces protéines soit complète, un signal de co-stimulation doit venir s'ajouter à la liaison du TCR avec le CMH présentant l'antigène. Cette co-stimulation est médiée par la molécule de surface CD28 qui doit être stimulée par les molécules CD80 et CD86 de la CPA¹²⁴.

La protéine LCK activée peut à son tour activer FYN et ZAP70 ce qui permet l'activation de la protéine adaptatrice LAT (Linker for Activated T cells)¹²⁵ qui induit la stimulation de la phospholipase C gamma1 PLC γ 1. La PLC γ 1 est responsable de la production des seconds messagers diacylglycerol (DAG) et inositol triphosphate (IP3) par le clivage du phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate (PIP2). Le DAG active notamment les voies PKC θ ¹²⁶ et RAS¹²⁷, alors que l'IP3 se lie à la surface du réticulum endoplasmique et permet la libération de calcium qui induit l'activation des facteurs de transcription NF-kB et NFAT^{128,129} (Figure 14¹³⁰).

Suite à la stimulation de ces nombreuses voies, les lymphocytes T prolifèrent et se différencient. L'intervention de ces diverses voies a également pour effet d'inhiber l'apoptose des lymphocytes T (Vu précédemment pour PKC θ , NF-kB, et détails plus bas en ce qui concerne RAS). La co-stimulation du CD28 a également un effet anti-apoptotique par l'augmentation de l'expression de BCL-XL¹³¹.

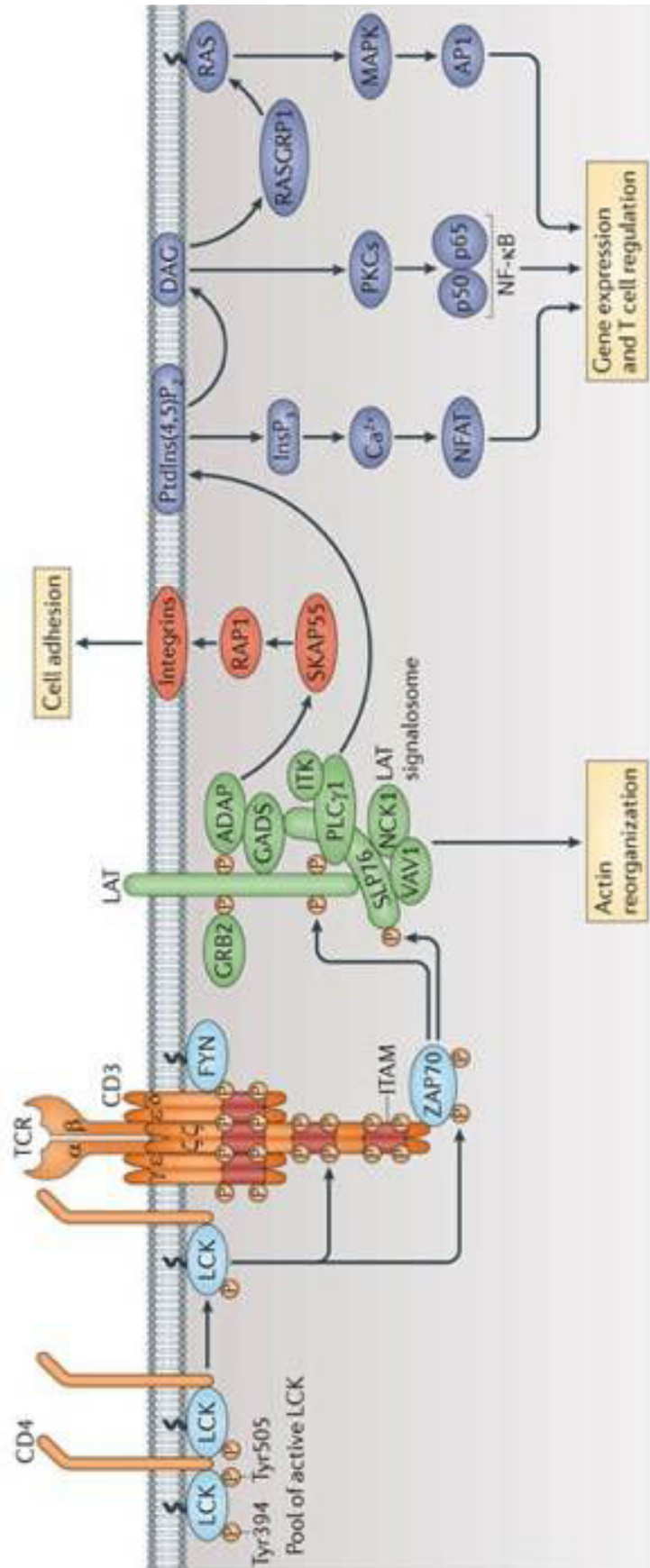


Figure 14 : Représentation schématique de la signalisation intracellulaire induite par la stimulation du TCR, d'après Brownlie et Al.¹³⁰

Ces évènements doivent cependant être soutenus par des signaux de co-stimulation et survie produits et perçus par les lymphocytes au cours de leur activation et différenciation. L'Interleukine 2, une cytokine produite par les lymphocytes T4 (LTCD4+), est l'une des principales molécules de survie. Ces signaux de survie vont permettre aux lymphocytes T8 (LTCD8+) de continuer à exercer leur action cytotoxique sur les cellules présentant l'antigène responsable de la réaction immunitaire.

2. Contrôle de la réponse immunitaire T par l'apoptose

Au cours de la phase de prolifération de la réponse immunitaire, maintenir un contrôle est essentiel pour éviter une réponse excessive pouvant mener à un processus immuno-pathologique ou auto-immun. Ce contrôle est exercé par l'Activation Induced Cell Death (AICD). De plus, après élimination de l'antigène déclencheur, une phase de contraction de la réponse enclenchée devient nécessaire, afin de maintenir l'homéostasie lymphocytaire. Cette contraction est effectuée par le processus d'Activated Cell Autonomous Death (ACAD)(Figure 15, ¹³²).

Nous verrons plus bas que lorsque l'un ou l'autre de ces mécanismes est défectueux, des maladies auto-immunes et potentiellement malignes en rapport avec une lympho-prolifération peuvent survenir, telles que l'ALPS et le RALD.

a) *Activation Induced Cell Death*

L'AICD est un mécanisme régulateur de la réponse immunitaire qui agit en maintenant un rétrocontrôle négatif sur cette dernière¹³³. L'AICD des lymphocytes T4 est majoritairement effectuée par la voie FAS-LIGAND/FAS¹³⁴. Dans le cas des lymphocytes T8, en plus de cette voie de signalisation d'autres y collaborent¹³⁵. Ainsi, une partie de l'AICD des lymphocytes T8 fait intervenir la voie des perforines et granzymes¹³⁶, une autre part étant prise en charge par la voie mitochondriale déclenchée par BIM¹³⁷, et une part minoritaire étant dépendante d'autres récepteurs de mort, en particulier TRAIL¹³⁸.

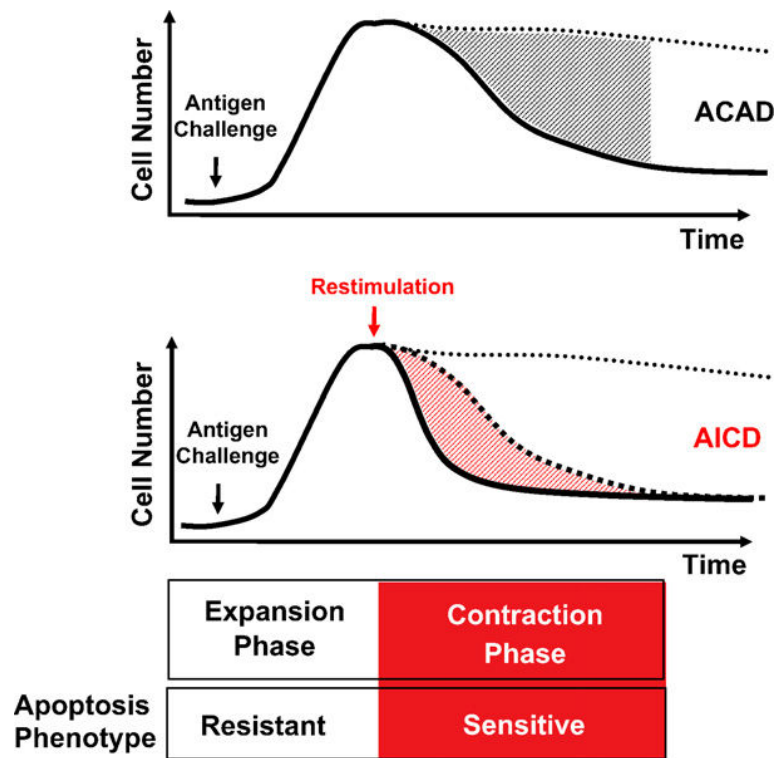


Figure 15 : Représentation schématique du contrôle de la réponse immunitaire T d'après Brenner et Al¹³².

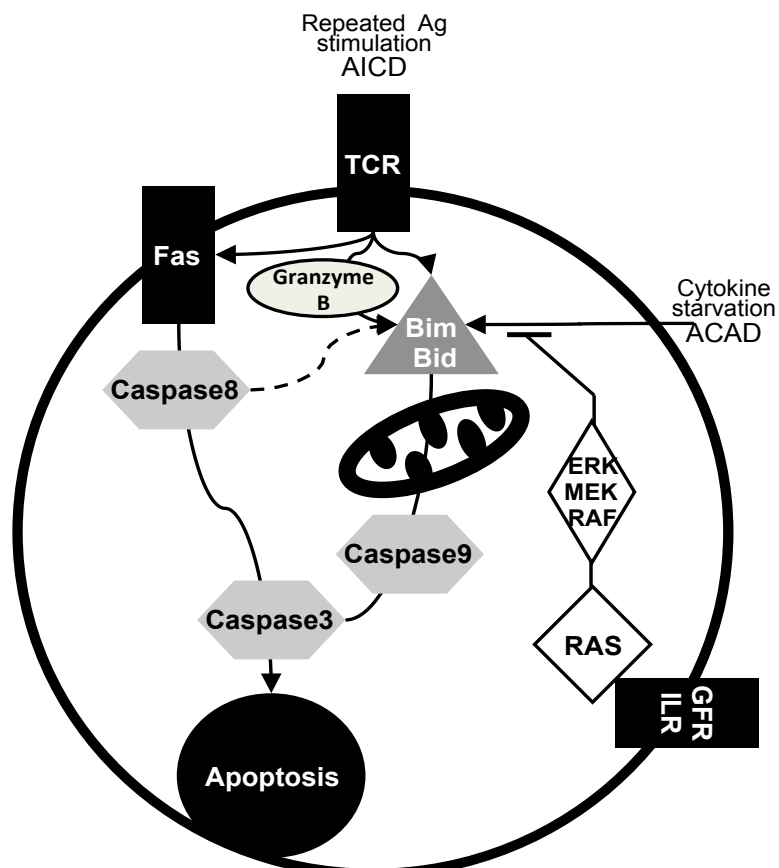


Figure 16 : Représentation schématique de l'AICD et de l'ACAD

Lors du déclenchement de la réponse immunitaire, nous avons vu que la stimulation du TCR entraîne l'activation de voies de signalisation qui ont pour effets de favoriser la survie et la prolifération des lymphocytes T. En parallèle, la protéine FAS, qui est exprimée de façon ubiquitaire, a une expression particulièrement augmentée à la surface des lymphocytes activés. L'expression de FAS-LIGAND qui est faible dans les lymphocytes au repos augmente lors de la stimulation répétée ou prolongée de leur TCR, sous l'influence de l'IL-2¹³⁹. L'IL-2 entraîne également la dégradation et la régulation négative de la transcription de la protéine inhibitrice de l'apoptose FLIP. Cependant, les lymphocytes T activés restent insensibles à l'apoptose au début de la réponse immunitaire. Nous verrons donc ci-dessous comment l'AICD est déclenchée malgré tout par la stimulation répétée du TCR et quel événement clef sensibilise les cellules à l'apoptose lors de ce processus. La répression de la voie NF-kB est indispensable à la susceptibilité des lymphocytes T activés à l'AICD. En effet, nous avons décrit plus haut l'activation de la transcription de plusieurs protéines inhibitrices du processus apoptotique par la voie NF-kB. C'est la protéine HPK1 qui permet de réguler l'activité de ce facteur de transcription. Ainsi, cette sérine thréonine kinase est essentielle à l'activation du NF-kB lorsqu'elle est sous sa forme non clivée. Clivée par la stimulation répétée ou prolongée du TCR¹⁴⁰, HPK1 bloque l'activation de IKK et supprime l'activité de la voie NF-kB¹⁴¹.

b) Activated Cells Autonomous Death

L'ACAD est une apoptose des lymphocytes T activés indépendante de la stimulation du TCR et des récepteurs de mort^{142,143}. On l'appelle également l'apoptose par sevrage en cytokines. L'ACAD est dépendante de la voie intrinsèque de l'apoptose, et déclenchée par la phosphorylation activatrice de BIM¹⁸. Il semblerait qu'une étape préliminaire à l'activation de BIM serait la diminution de BCL-2¹⁴⁴. Dans tous les cas, le sevrage en IL-2 ou autres chaînes gamma de cytokines entraîne de façon spécifique une régulation positive et une activation de BIM. En effet, lors du retrait des cytokines de leurs récepteurs à la surface des lymphocytes T, la voie RAS préalablement active cesse son activité de phosphorylation de ERK, elle-même responsable de l'absence d'activation de BIM¹⁴⁵.

3. Défauts de contrôle de la réponse immunitaire T par l'apoptose

a) *Autoimmune LymphoProliferative Syndrome*

L'ALPS est une maladie chronique d'origine génétique qui apparaît dans l'enfance, au cours de laquelle surviennent des manifestations auto-immunes à type de cytopénies auto-immunes essentiellement ; une lympho-prolifération bénigne avec splénomégalie et lymphadénopathies ; et qui expose à un risque augmenté de développer un lymphome¹⁴⁶.

Il existe des marqueurs biologiques spécifiques de l'ALPS, à savoir une augmentation des taux plasmatiques de FAS-LIGAND, IL-10, vitamine B12 et immunoglobulines ; ainsi que l'excès d'une population lymphocytaire particulière appelée lymphocytes TCR $\alpha\beta$ double négatifs (LTDN)¹⁴⁷. Les LTDN n'expriment ni le CD4 ni le CD8 alors même que ce sont des lymphocytes matures. Il est généralement admis que ces lymphocytes proviennent d'une population de lymphocytes T CD8+ très activés et qui à défaut de mourir par le processus normal d'apoptose, diminuent d'eux-mêmes leur expression du CD8^{148,149}. Il a été décrit plus récemment que les LTDN dérivent des lymphocytes T mémoires effecteurs (TEMRA) et également des LTCD4+¹⁵⁰. Toujours sur le plan biologique, on peut mettre en évidence *in vitro* sur des lymphocytes T activés provenant des patients un défaut d'apoptose induit par FAS, partiellement compensé par la voie des granzymes lors de l'AICD¹³⁶. Ces patients ne présentent pas de défaut d'ACAD.

Sur le plan génétique, la majorité des patients atteints d'ALPS sont porteurs de mutations hétérozygotes de FAS^{9,134}. Ces mutations peuvent être détectées sur la lignée germinale, mais peuvent également être somatiques¹⁵¹. De plus en plus de cas de patients porteurs de mutations germinales associées à des mutations somatiques additionnelles de FAS sont décrits¹⁵². Dans de plus rares cas, ce sont des mutations de FAS-LIGAND¹⁵³⁻¹⁵⁵ qui entraînent la maladie. Des mutations de CASPASE 10¹⁵⁶ ont été décrites dans un cas, mais le rôle de cette caspase dans l'apoptose médiée par FAS et donc dans l'ALPS reste controversé. Les mutations de CASPASE 8¹⁵⁷ et FADD¹⁵⁸ entraînent elles un déficit immunitaire, lié à leur rôle dans la signalisation du TCR.

L'ALPS est ainsi un exemple type des conséquences pathologiques liées à un défaut de régulation de la réponse immunitaire T par l'apoptose, en particulier l'AICD. Il existe cependant des patients n'ayant pas les mutations décrites ci-dessus atteints de symptômes similaires à ceux des patients atteints d'ALPS et pour lesquels l'apoptose induite par FAS et l'AICD ne sont pas atteintes, mais qui présentent un défaut *in vitro* d'ACAD en rapport avec des mutations des gènes codant pour les protéines KRAS et NRAS. C'est la description de ces patients qui a mené à la découverte du RALD.

b) *RAS-Associated Lymphoproliferative Disease*

Décrit plus récemment, et représentant pour l'instant un nombre limité de patients, le RALD se manifeste également par des cytopénies auto-immunes, une lympho-prolifération et un risque augmenté de lymphome ou leucémie¹⁴⁵.

Les patients atteints de RALD n'ont pas d'augmentation des marqueurs biologiques de l'ALPS, bien que les immunoglobulines puissent aussi être augmentées, et que parfois les LTDN soient présents en léger excès. Sur le plan fonctionnel *in vitro*, les lymphocytes activés provenant de ces patients n'ont pas de défaut d'AICD, mais présentent un défaut d'ACAD, en lien avec une diminution de la protéine pro-apoptotique BIM^{145,159,160}. Ces patients présentent des mutations activatrices de NRAS et KRAS, au niveau des codons 12, 13 et 61. Il résulte de l'hyperactivité de la voie RAS une phosphorylation de ERK, elle-même entraînant la phosphorylation de la sérine 69 de BIM ce qui la conduit au protéasome pour dégradation.

Les mutations présentées par ces patients sont les mêmes que celles retrouvées chez des patients atteints de leucémies myélo-monocytaires juvéniles chroniques (JMML), et les patients eux-mêmes peuvent présenter des signes de myélo-prolifération associés à la maladie des lymphocytes¹⁶¹. L'importance de la voie RAS dans le contrôle de la réponse immunitaire T mise en évidence par ce modèle pathologique nous a poussés à étudier plus en avant l'influence de la voie RAS sur l'apoptose lymphocytaire T au cours de la régulation de la réponse immune.

C. VOIE RAS

1. Généralités sur l'oncogène *RAS*

L'étude des gènes et protéines *RAS* a débuté il y a une cinquantaine d'années, avec la découverte en 1964 par J. Harvey que l'injection d'une préparation d'un virus leucémique extrait d'un rat atteint de leucémie (Ha-MSV) induisait des sarcomes chez des rongeurs nouveaux nés¹⁶². Trois autres virus furent identifiés par la suite, pour lesquels on fit la preuve rétrospectivement qu'ils contenaient des oncogènes de type *RAS*: le Kirsten-MSV (Ki-MSV)¹⁶³, le BALB-MSV¹⁶⁴, et le Rasheed-MSV¹⁶⁵. C'est en 1975 qu'il fut démontré que Ha-MSV et Ki-MSV étaient des virus recombinants qui contenaient des séquences issues du génome du rat¹⁶⁶. En 1982, les séquences nucléotidiques de *HRAS* (Ha-MSV Rat Sarcoma) et *KRAS* (Ki-MSV Rat Sarcoma) furent publiées¹⁶⁷. En 1983 le troisième membre de cette famille d'oncogènes fut identifié ; *NRAS*^{168,169}. Parmi les 3 membres de la famille *RAS*, c'est *NRAS* dont le potentiel de transformation est le plus fort au sein de la lignée hématopoïétique¹⁷⁰.

C'est à la même période que fut définie la notion d'oncogènes humains, c'est à dire de gènes transformants, induisant des tumeurs, et d'origine humaine. Peu après, furent apportées les preuves que les oncogènes humains récemment découverts étaient identiques aux oncogènes murins *RAS*^{171,172} et porteurs de mutations activatrices¹⁷³⁻¹⁷⁵. En effet, contrairement à leurs homologues murins, les gènes *RAS* humains n'ont pas la capacité de conférer la malignité à des cellules en culture en l'absence de ces mutations, bien que ce ne soit que des mutations ponctuelles et d'une seule base. Ainsi, l'identification d'une telle mutation de *KRAS* dans une biopsie de cancer du poumon d'un patient alors qu'elle était absente du parenchyme pulmonaire normal et des leucocytes en était la preuve de principe¹⁷⁶. Par la suite, ces mutations activatrices de *RAS* furent trouvées dans de nombreux carcinomes : du colon, des poumons, du pancréas¹⁷⁷⁻¹⁸⁰...

C'est également à ce moment que fut découverte la notion de coopération entre plusieurs oncogènes dans la genèse tumorale, nécessaire à la transformation de lignées cellulaires ; entre *RAS* et *MYC*, ou *RAS* et l'adénovirus *E1A* par exemple^{181,182}.

2. Activation normale des protéines RAS

Les protéines codées par les gènes *RAS* sont des GTPases médiatrices de signaux transduits à travers la membrane plasmique. Ces signaux sont issus de stimulations par des mitogènes, comme cela a été montré pour la première fois avec l'épidermal growth factor (EGF)¹⁸³. Leur activité GTPase est soumise à l'influence de facteurs activateurs permettant la liaison de la protéine RAS à du GTP, dits GTPase activating proteins (GAP), comme SOS, et de facteurs inhibiteurs ayant l'activité inverse appelés guanine nucleotide exchange factors (GNEF, Figure 17), comme NF1 et GAP. Lors de l'activation des récepteurs des facteurs de croissance ou interleukines, c'est à dire de récepteurs de type tyrosine protéine kinases, la protéine adaptatrice GRB2 se lie par son domaine SH2 (SRC homology domain 2) au récepteur activé et par son domaine SH3 aux protéines SOS.

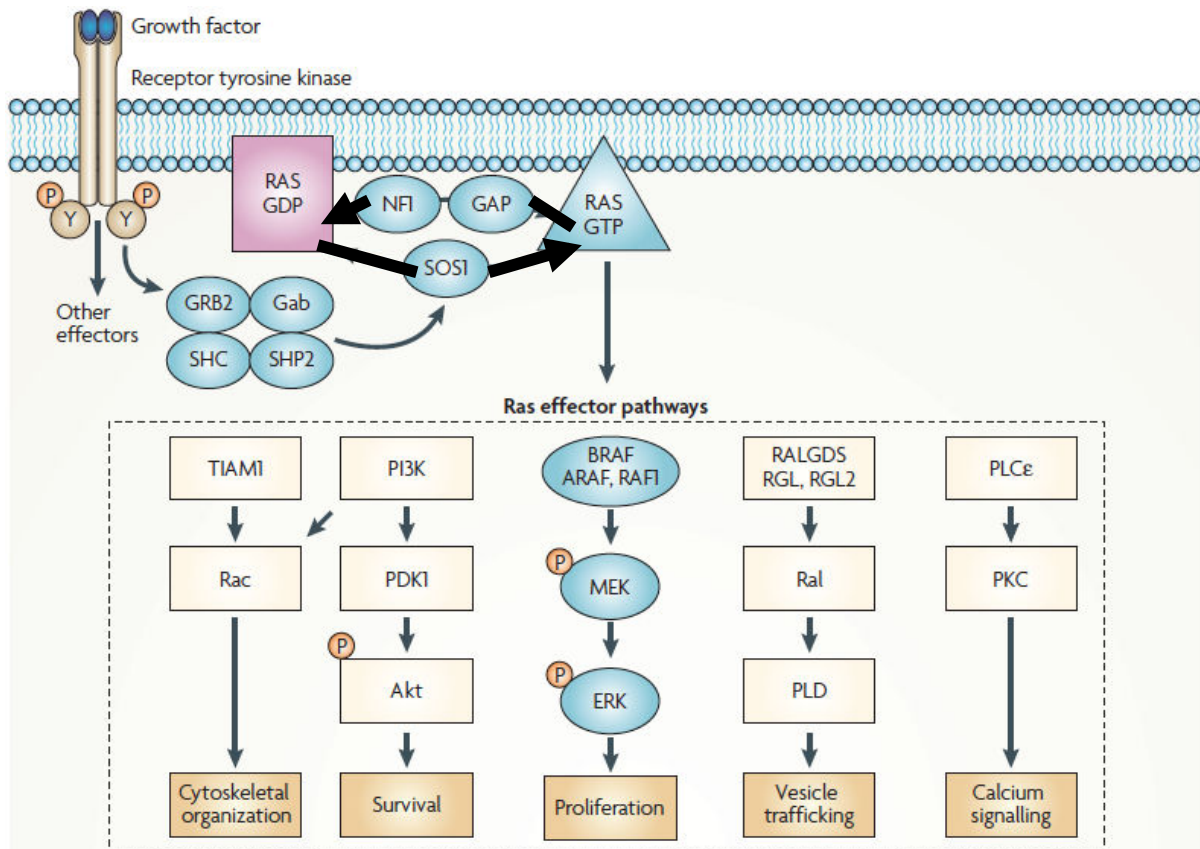


Figure 17 : Représentation schématique de l'activation de la voie RAS et de ses effecteurs, d'après Schubert et Al¹⁸⁴.

D'autres facteurs favorisant l'action des GAPs sont l'afflux calcique, le DAG issu du clivage du PIP2 par la phospholipase C epsilon, et la PKC activée par les esters de phorbol.

Les protéines CBL¹⁸⁵, SPROUTY^{186,187} et ACK1¹⁸⁸ se lient à GRB2 pour empêcher l'activation de SOS. L'inhibition de la voie RAS par CBL passe également par son activité ubiquitine ligase sur les récepteurs de type protéine tyrosine kinase¹⁸⁹.

De nombreuses voies sont activées par l'activité GTPase de RAS, impliquées dans la survie, la prolifération, le trafic vésiculaire, l'organisation du cytosquelette et la signalisation calcique. Nous détaillerons les voies spécifiquement activées au sein des lymphocytes.

3. Voie RAS dans les lymphocytes T

Lors de la stimulation antigénique du TCR, la protéine adaptatrice LAT, substrat de ZAP70 et LCK, recrute GRB2 et SOS permettant ainsi l'activation de la voie RAS^{190,191}. La protéine adaptatrice SLP76 se lie également à LAT, par l'intermédiaire de protéines ressemblant à GRB2 telles que GADS, GRPL, GRF40. SLP76 est nécessaire à l'activation de la voie RAS dans les lymphocytes T activés^{192,193}. Le DAG produit par la transmission du signal par le TCR est également un facteur d'activation de RAS¹⁹⁴ (Figure 18). La stimulation des récepteurs de cytokines par l'IL-2 et l'IL-15 entraîne aussi l'activation de la voie RAS au sein des lymphocytes T.

La voie effectrice de RAS médiée par RAF-1 phosphoryle et active la kinase MEK qui à son tour active les mitogen activated protein kinases (MAPK) dites Extra cellular signal regulated kinases (ERK) 1 et 2. Cette voie est importante lors du développement des lymphocytes T au moment de leur différenciation dans le thymus¹⁹⁵. Dans cette lignée, les substrats des MAPK sont variés. On y trouve la protéine kinase p56LCK, l'Oncoprotéine 18, régulatrice de la dynamique des microtubules¹⁹⁶, des facteurs de transcription tels que ELK-1, contrôlant entre-autres les gènes des familles *c-FOS*,

*EGR*¹⁹⁷, *STAT3*¹⁹⁸, dont la phosphorylation est essentielle à l'orientation des lymphocytes activés vers la prolifération et différenciation.

RAP1 est une GTPase ayant 50% d'homologie avec RAS pouvant entrer en compétition avec RAS. La liaison du TCR avec un antigène entraîne son activation et il semblerait qu'elle antagonise la transduction du signal du TCR¹⁹⁹, inhibant l'interaction de RAS et RAF-1.

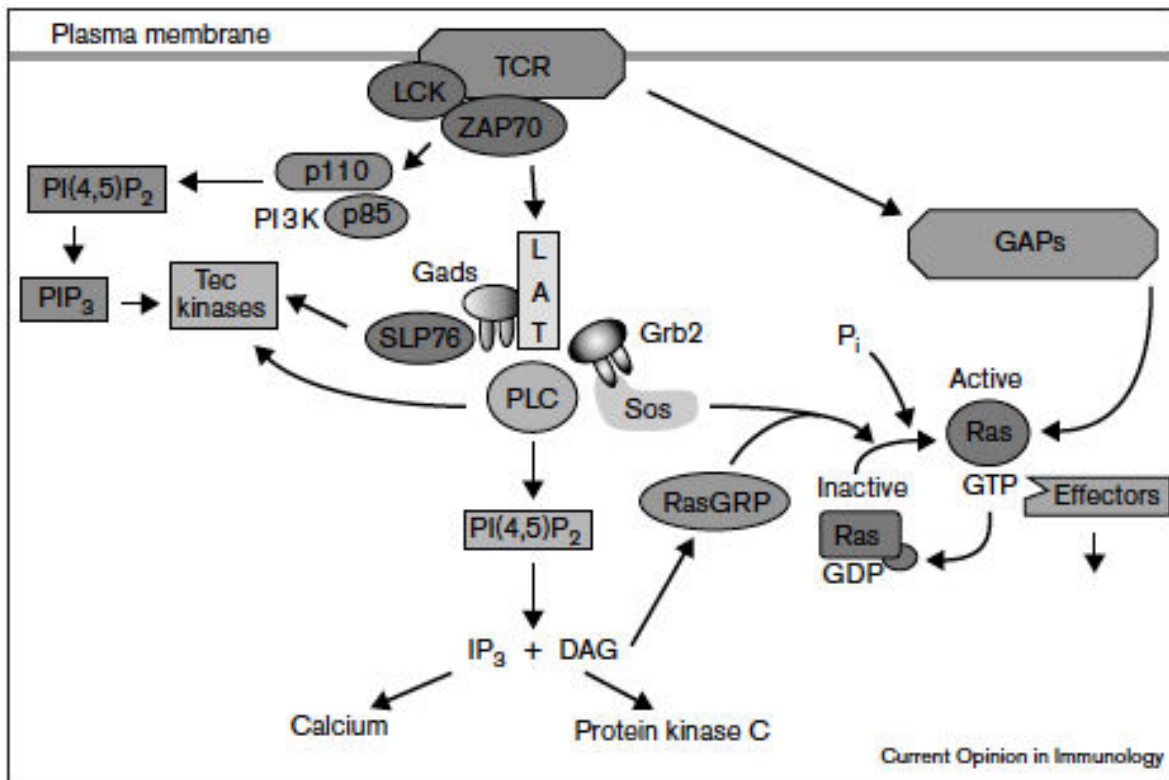


Figure 18 : Représentation schématique de l'activation de RAS lors de la stimulation du TCR, d'après Genot et Al²⁰⁰.

La production de cytokines par les lymphocytes T activés est dépendante de l'activation de la voie RAS, mais la phosphorylation de MEK n'est pas indispensable au cours de ce processus¹⁹⁵. De plus, l'activation par RAS des facteurs de transcription NFAT, NF- κ B et AP-1 n'est pas médiée par les MAPK. Cette activation est médiée par RAC, une GTPase de la famille RHO, qui, contrairement à ce qui est observé dans les fibroblastes, est bien activée par RAS mais de façon indépendante de la PI3K^{201,202}. Dans d'autres types cellulaires, PI3K est un effecteur majeur de RAS^{203,204}, entraînant une prolifération et une inhibition de la mort cellulaire.

Ainsi, au sein des lymphocytes T activés, c'est la voie RAS-RAF-1-MEK-ERK qui est la plus active et la plus étudiée. Lorsque nous détaillerons les interactions des voies initiées par RAS avec l'apoptose lors de la réponse immune T nous nous pencherons plus en détails sur la voie de RAF-MEK-ERK pour cette raison.

4. Voie RAS et apoptose

De nombreuses études se sont intéressées à l'influence de l'activation de la voie RAS sur l'apoptose, et nous synthétiserons ici les principaux résultats obtenus chez l'homme, en gardant cependant en mémoire que les résultats obtenus ne s'appliquent pas nécessairement aux lymphocytes T activés.

a) PI3K et apoptose

Tout d'abord, en ce qui concerne la voie de la PI3K, qui comme nous l'avons vu précédemment n'est pas une cible préférentielle de RAS dans le type cellulaire qui nous intéresse^{197,200,201}, l'ensemble des travaux effectués montre que cet effecteur de RAS a des effets anti-apoptotiques. Une fois activée par RAS, la PI3K active à son tour la sérine/thréonine kinase AKT²⁰⁵ qui phosphoryle BAD, ainsi rendue inactive. Ceci a été démontré dans la lignée cellulaire 293T (cellules embryonnaires rénales humaines)^{61,206-208}. Dans la même lignée, il a été démontré qu'AKT phosphoryle CASPASE 9 inhibant par là la voie mitochondriale de l'apoptose⁶², qu'après son activation AKT peut aussi se relocaliser dans le noyau^{209,210} et cibler les facteurs de transcription de la famille Forkhead, les phosphoryler entraînant ainsi leur séquestration dans le cytoplasme²¹¹ et l'absence de liaison aux promoteurs de FAS-LIGAND, TRAIL, BIM, PUMA comme nous l'avons vu plus haut. De plus, dans des cellules épithéliales intestinales humaines, BAK est une cible d'AKT²¹³, et BCL-XL n'est plus négativement régulé toujours sous son action²¹⁴. La voie PI3K a donc des effets anti-apoptotiques au niveau de la voie mitochondriale de l'apoptose.

b) *RAC et apoptose*

Nous avons détaillé plus haut les effets anti-apoptotiques de la voie du NF- κ B, par lequel RAS a également une action anti-apoptotique puisque dans les lymphocytes T comme dans les autres types cellulaires, l'activation de RAC par RAS entraîne une activation de NF- κ B.

c) *RAF-MEK-ERK et apoptose*

Nous nous intéresserons à présent aux effets de cette voie des MAPK sur l'apoptose, ceux-ci ayant été décrits comme pouvant être pro ou anti-apoptotiques selon les circonstances.

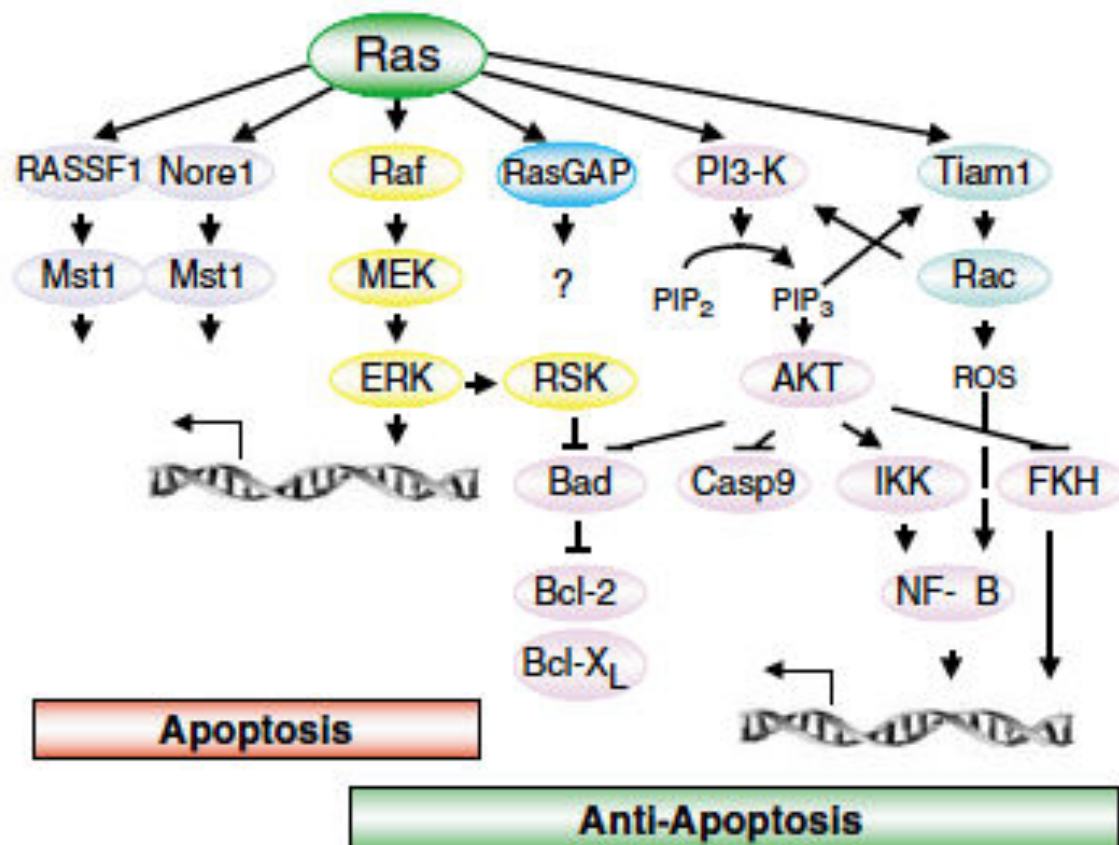


Figure 19 : Représentation schématique de l'influence de RAS sur l'apoptose indépendamment du type cellulaire et du stimulus, d'après Cox et Der²¹⁵.

(1) Inhibition de l'apoptose par MEK-ERK

(a) *Inhibition de la voie extrinsèque*

L'activation anormale de la voie des MAPK MEK-ERK par RAS entraîne une augmentation de l'ARN messager de l'inhibiteur du DISC FLIP, dans des fibroblastes²¹⁶, cellules musculaires lisses vasculaires²¹⁷ et la lignée Jurkat issue d'une leucémie T humaine²¹⁸.

Ces MAPK ont également un effet inhibiteur du DISC en agissant au niveau du clivage de la caspase 8, comme cela a été démontré sur une lignée HeLa dérivée d'un cancer du col de l'utérus humain^{219,220} et sur des cellules Jurkat^{221,222}.

Enfin, MEK-ERK ont une action de phosphorylation de FADD empêchant son recrutement au niveau du DISC que ce soit dans des neutrophiles²²³ ou des cellules issues d'une leucémie lymphoïde²²⁴.

(b) *Inhibition de la voie intrinsèque*

L'activation de la voie mitochondriale de l'apoptose est inhibée par les MAPK MEK qui en phosphorylant ERK ½ leur permettent de phosphoryler BIM au niveau de la sérine en position 69, ce qui entraîne une diminution de son expression suite à sa dégradation par le protéasome. Ceci a été observé dans des cellules épithéliales mammaires humaines²²⁵, dans des cellules K562 issues d'une leucémie myéloïde chronique acutisée humaine²²⁶ et dans des lymphocytes T activés, dans le cas des patients atteints de RALD¹⁴⁵.

Par ailleurs, dans des cellules issues de cancer du sein²²⁷ ou mélanomateuses²²⁸, l'activation de ERK ½ par les MAPK a une action protectrice vis à vis de l'apoptose en inhibant la relocalisation de BAX du cytosol vers la mitochondrie. De plus, la phosphorylation de BAD sur le sérine en position 112 inhibe également l'apoptose mitochondriale, que ce soit dans des neurones²²⁹ ou lymphocytes humains²³⁰.

En ce qui concerne l'action de la voie des MAPK MEK-ERK sur les inhibiteurs de l'apoptose intrinsèque, l'augmentation de la transcription de MCL1 a été observée dans la lignée TF-1 issue d'une leucémie myéloïde aigüe humaine²³¹, celle de BCL-XL dans des cellules issues d'épithélium mammaire humain²³². La phosphorylation entraînant une inhibition de la dégradation de BCL-2 a elle été démontrée sur des cellules épithéliales de cordon ombilical humain^{233,234}.

(c) *Inhibition par XIAP*

Il a été observé sur des polynucléaires neutrophiles humains²³⁵, des monocytes humains²³⁶, des cellules dérivées de leucémie myéloïde aigüe²³⁷, des cellules issues de cancer du poumon à petites cellules²³⁸ et de mélanome²²⁸ que la voie des MAPK MEK-ERK entraîne une augmentation de l'expression de XIAP, inhibant ainsi l'apoptose.

(2) Promotion de l'apoptose par MEK-ERK

Dans diverses lignées humaines, l'activation de ERK $\frac{1}{2}$ peut a contrario entraîner l'augmentation de l'expression des récepteurs de mort. Ainsi, cela a été démontré dans des cellules issues de gliome²³⁹, des ostéoblastes²⁴⁰ et des cellules embryonnaires rénales²⁴¹ pour FAS, dans des cellules épithéliales coliques et issues de neuroblastome pour DR4 et DR5^{242,243}. L'augmentation de l'expression de FADD a été démontrée dans ces travaux suite à l'activation de cette voie des MAPK^{239,241}.

Au niveau de la voie intrinsèque, la l'activation des MAPK MEK-ERK peut entraîner le clivage de BID²⁴⁴ dans des cellules issues de cancer de prostate, être nécessaire à l'expression de BAK dans des cellules issues de myélome multiple²⁴⁵, à celle de BAX dans des cellules issues de mélanome²⁴⁶, ostéoblastes²⁴⁷ et cancer du col utérin²⁴⁸. Elle est également impliquée dans la diminution de l'expression de BCL-2 dans des cellules tumorales mammaires²⁴⁹⁻²⁵¹, prostatiques²⁴⁴ et ostéoblastiques²⁴⁰. De même l'expression de BCL-XL dans le cancer prostatique²⁴⁴.

La régulation des protéines de la famille BCL-2 en défaveur de la mort cellulaire par la voie des MAPK suite à la stimulation par un signal pro-apoptotique démontrée ci-dessus est cependant étroitement en lien avec l'activité du gène suppresseur de tumeurs *p53*. Ce n'est que dans une seule de ces études que l'activité de promotion de l'apoptose par la voie RAS/RAF/MEK/ERK est indépendante de *p53*²⁵¹. Nous avons vu plus haut quels liens le facteur de transcription *p53* entretient avec l'apoptose suite aux dommages à l'ADN.

L'activité pro-apoptotique de RAS active est donc intimement liée à celle de *p53*. Or, RAS peut avoir des effets favorisant et inhibant *p53*, par l'action phosphorylante sur *p14ARF* et MDM2. MDM2, une ubiquitine ligase, inhibe l'activité transcriptionnelle de *p53* en s'y liant, et est également une cible de *p53* qui dans une boucle de rétrocontrôle négatif initie sa transcription. La phosphorylation de ERK entraîne l'activation de MDM2²⁵², mais également celle de *p14ARF*²⁵³ qui se lie à MDM2 pour inhiber son activité²⁵⁴. Ainsi, selon le type cellulaire et le stimulus reçu par la cellule, la modification de la balance entre activation ou non de *p53* est la clef de la conséquence pro ou anti-apoptotique liée à l'activation des MAPK par la voie RAS.

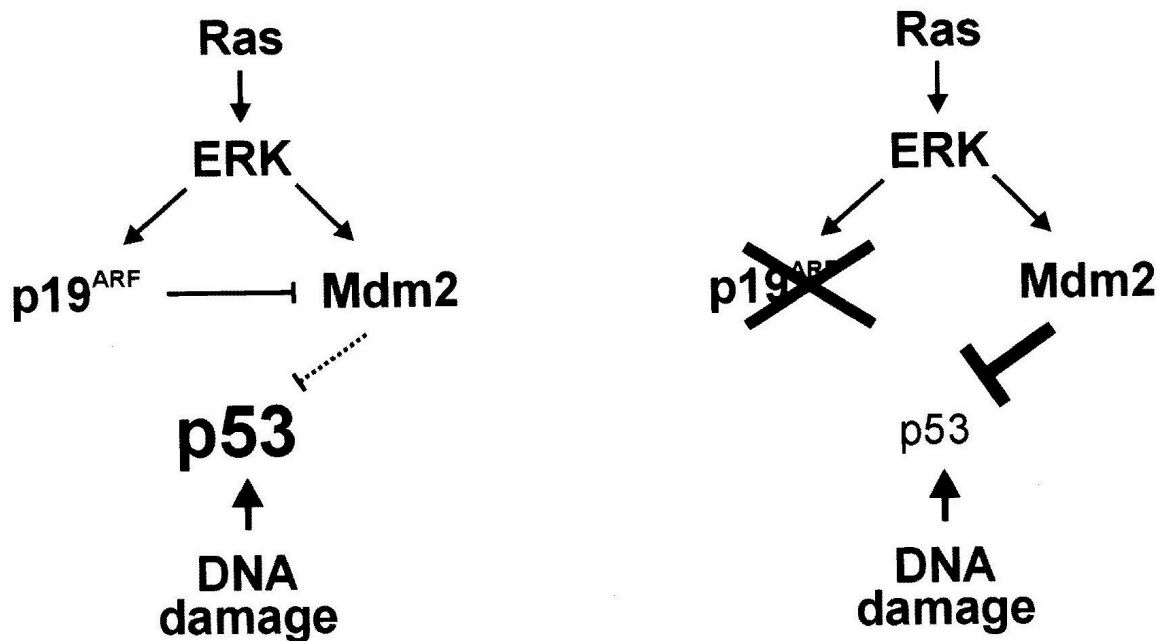


Figure 20 : Effets de RAS/ERK sur p53, p14ARF est l'homologue humain de p19ARF, d'après Ries et Al²⁵².

Afin de mieux connaître les effets de l'activation de la voie RAS sur les lymphocytes T activés humains recevant un stimulus de mort physiologique lors de la régulation de la réponse immunitaire, nous nous sommes penchés sur ceux porteurs de mutations activatrices *RAS*.

5. Mutations activatrices de *RAS*

Les protéines RAS sont des protéines monomériques globulaires dont le poids moléculaire est de 21 kDa et qui fonctionnent comme des interrupteurs, actives lorsqu'elles sont liées à du GTP, inactives lorsqu'elles sont liées à du GDP. Elles possèdent une activité GTPase intrinsèque faible, c'est pourquoi les GAPs sont nécessaires à leur retour à la forme inactive. Les mutations activatrices de RAS ont pour effet d'abolir leur activité GTPase intrinsèque et /ou de les rendre insensibles à l'action des GAPs^{255,256}.

Il existe des résidus glycine en 12^{ème} et 13^{ème} position de la protéine et un résidu glutamine en position 61, considérés comme "hotspots" de transformation oncogénique (Figure 21). En effet, les glycines en positions 12 et 13 n'ont pas de chaîne latérale. Or ce site étant situé au niveau de la boucle d'interaction avec le phosphate, la substitution avec un autre acide aminé à chaîne latérale viendrait gêner l'interaction stéréotaxique de RAS et du gamma phosphate. La glutamine 61 a elle un rôle essentiel dans l'interaction par un pont hydrogène entre RAS et GAP p120, crucial pour l'hydrolyse du GTP^{256,257}.

Les mutations activatrices de *RAS* peuvent être germinales ou somatiques, entraînant des conséquences différentes selon le locus muté, et le type cellulaire atteint. Nous détaillons ici les mutations de *NRAS*, *KRAS* et *HRAS* retrouvées chez l'homme au cours de diverses pathologies.

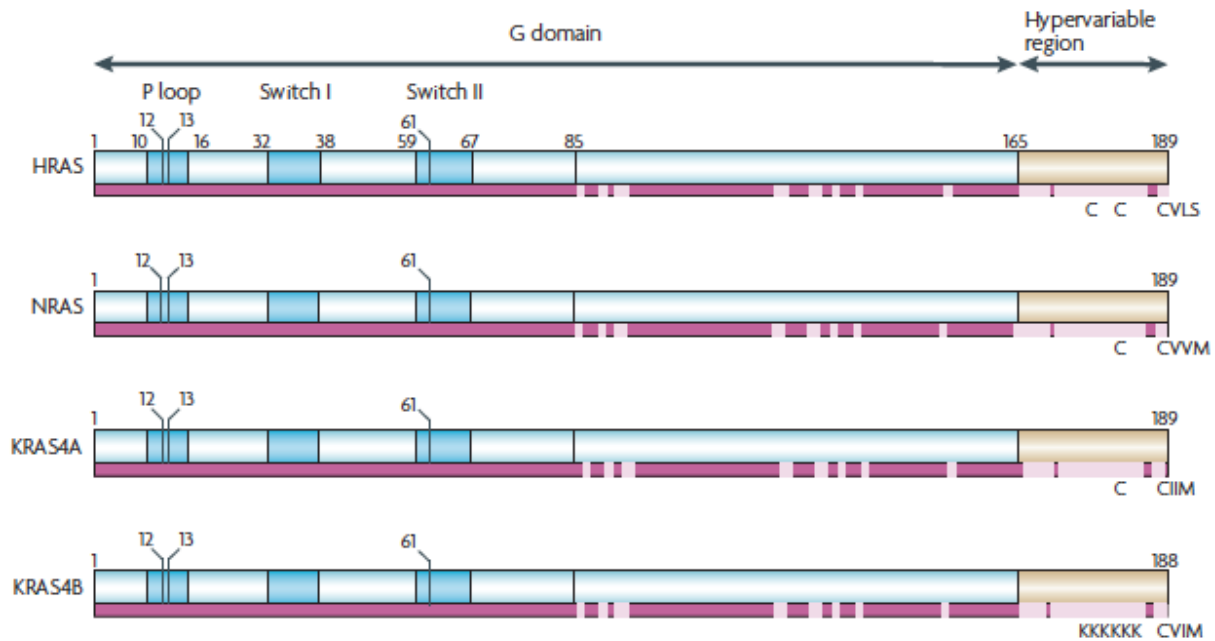


Figure 21 : Représentation schématique des isoformes de RAS, d'après Schubbert et Al.¹⁸⁴. Les 85 premiers acides aminés sont identiques et se lient aux GTP/GDP. P-loop : boucle de liaison au phosphate, Switch I et II : liaison de RAS aux régulateurs et effecteurs. La région hypervariable est utilisée pour la localisation de la protéine.

6. Pathologies liées à une activation anormale de RAS

a) Mutations germinales

Les syndromes de Noonan, Costello et Cardio-Facio-Cutané (CFC) sont trois entités proches, pouvant être induites par des mutations activatrices de la lignée germinale de *RAS*. Ces maladies développementales associent un retard staturo-pondéral et psychomoteur, une dysmorphie faciale, des anomalies squelettiques et cardiaques ainsi que des lésions cutanées pigmentées. Les patients atteints de ces syndromes sont à risque de développer des maladies malignes, telles que des JMML, rhabdomyosarcomes, neuroblastomes, ganglio-neuroblastomes, cancers de la vessie.

Dans le cas du syndrome de Costello, ce sont des mutations de *HRAS* qui sont retrouvées, essentiellement au niveau des 12 et 13^{ème} codons, mais également au niveau des codons 117 et 146²⁵⁸⁻²⁶¹. Les maladies malignes associées à ce syndrome n'incluent pas les JMML, et dans ces cancers, une perte de l'allèle non muté est le plus souvent trouvée.

Dans les syndromes de Noonan et CFC, ce sont des mutations de *KRAS* qui sont retrouvées, mais majoritairement sur d'autres sites que les hotspots précédemment décrits, entraînant un gain d'activité moins important. L'apparition d'une JMML a été rapportée dans un cas de mutation de *KRAS* T58I²⁶². Plus récemment, des mutations de *NRAS* ont également été trouvées chez des patients présentant un syndrome de Noonan, au niveau cette fois des résidus 50 et 60, sans qu'une JMML y soit associée²⁶³.

Un seul cas de mutation de la lignée germinale de *NRAS* sur un hotspot, G13D, a été rapporté à ce jour et ce malgré des recherches extensives²⁶⁴. Le patient ne présentait pas de syndrome de Noonan et a développé une JMML²⁶⁵.

b) Mutations somatiques

(1) Cancers et hémopathies malignes

On retrouve des mutations somatiques des gènes RAS dans plus de 30% de l'ensemble des cancers de l'homme (Tableau 4).

Localisation	KRAS (%)	HRAS (%)	NRAS (%)	Total (%)
Pancréas	71	0	<1	71
Colon	35	1	6	42
Intestin grêle	35	0	<1	35
Tractus biliaire	26	0	2	28
Endomètre	17	<1	5	22
Poumon	19	<1	1	20
Mélanome	1	1	18	20
Col utérin	8	9	2	19
Tractus urinaire	5	10	1	16

Tableau 4 : Mutations somatiques de RAS selon la 67^{ème} version du catalogue des mutations somatiques dans les cancers, sont listés les cancers pour lesquels on retrouve au moins 15% de mutations de RAS, d'après Stephen et Al.²⁶⁶

En ce qui concerne les hémopathies malignes, on retrouve des mutations de *NRAS* et parfois *KRAS* comme événements génétiques secondaires dans 15-18% des myélomes

multiples²⁶⁷⁻²⁶⁹, 10% des leucémies lymphoïdes aigües T de l'adulte²⁷⁰, 6-20% des leucémies aigües lymphoblastiques de l'enfant²⁷¹⁻²⁷³, 20-30% des leucémies myélo-monocytaires chroniques de l'adulte²⁷⁴.

(2) Leucémies Myélo-Monocytaires Juvéniles chroniques

Dans le cas des JMML, on retrouve des mutations de *NRAS* et *KRAS* sur les codons 12, 13 et 61 dans 25% des cas²⁷⁵, la particularité de ce syndrome étant que contrairement à ce qui est vu dans les autres hémopathies malignes, les mutations de *RAS* ne sont pas associées aux autres mutations causales de la maladie, et ne sont plus considérées comme événement génétique secondaire mais comme unique événement responsable du déclenchement de la maladie.

La JMML est une myéloprolifération et myélodysplasie maligne agressive de la petite enfance, plus de la moitié des cas étant diagnostiqués avant l'âge de deux ans²⁷⁵. Sa rareté, car elle touche entre 0,6 et 4 enfants par million²⁷⁶ soit 10 nouveaux cas par en en France métropolitaine²⁷⁷, n'enlève rien à sa sévérité. En effet, le seul traitement curatif à l'heure actuelle est la greffe de moelle, mais le taux de rechute est élevé même lorsque ce traitement est entrepris, aux alentours de 35%²⁷⁸.

Sur le plan physiopathologique, les JMML sont secondaires à une hyperactivation de la voie RAS, liée à des mutations soit de la lignée germinale soit atteignant des cellules souches hématopoïétiques au niveau d'un progéniteur précoce, capable de se différencier en cellules granuleuses, monocytes, érythrocytes et lymphocytes (B, T, NK)²⁷⁹. L'hyperactivation de la voie RAS dans ces cellules entraîne une pousse spontanée des progéniteurs myéloïdes et une hypersensibilité au GM-CSF *in vitro* caractéristiques de cette maladie. Elle entraîne également cette prolifération excessive de la lignée myélomonocytaire, parfois lymphocytaire, pouvant envahir les organes vitaux et être responsable du décès des patients.

Sur le plan génétique, les mutations constitutionnelles sur la voie *RAS* responsables de JMML sont des mutations de *PTPN11*, *NF1* et *cCBL*; associées aux

syndromes de Noonan, à la neurofibromatose de type 1 et au Syndrome CBL, voisin du syndrome de Noonan. Les mutations somatiques concernent encore *PTPN11*, mais aussi *KRAS* et *NRAS*.

Sur le plan de la présentation clinique, la plupart des patients ont une splénomégalie au diagnostic, parfois associée à une hépatomégalie et des adénopathies, souvent concomitante d'une pâleur cutanéomuqueuse, voire d'une éruption cutanée, de manifestations respiratoires et digestives. Sur le plan biologique le frottis sanguin est très informatif et rapporte une hyperleucocytose avec monocytose et myélémie. La moelle elle est de richesse augmentée avec hyperplasie granuleuse. Le diagnostic de JMML repose sur un faisceau d'arguments, avec des critères requis et des critères accessoires indiqués dans le tableau ci-dessous²⁸⁰.

Catégorie 1 : <i>Tous requis</i>	Catégorie 2 : <i>Au moins 1 requis</i>	Catégorie 3 : <i>Au moins 2 si aucun Ctg 2</i>
> 10 ⁹ /l monocytes circulants	Mutation somatique de <i>RAS</i> ou <i>PTPN11</i> ou <i>cCBL</i>	Leucocytes > 20.10 ⁹ /l
<20% blastes médullaires	Mutation de NF1 ou diagnostic de Neurofibromatose de type 1	Myélémie
Pas de transcrit <i>BCR-ABL</i>	Monosomie 7	Augmentation de l'HbF
Splénomégalie		Anomalie cytogénétique clonale autre que mns7
		Hypersensibilité au GM-CSF

Tableau 5 : Critères diagnostiques des JMML.

Au niveau de l'évolution et du pronostic, la JMML est très hétérogène. Dans la plupart des cas la maladie est agressive, et le décès peut survenir rapidement suite à l'insuffisance médullaire, l'infiltration des organes ou la transformation en leucémie aiguë. On appelle ces cas "Sévères" (S-JMML). Cependant, rarement, la maladie reste stable, voire régresse. On appelle ces cas "Long survivors" (LS-JMML). A ce jour, il n'y a pas de réelle corrélation génotype-pronostic et il est impossible de prévoir l'évolution de la maladie selon la mutation présentée. Bien que quelques critères pronostiques soient avancés par certaines équipes, aucun n'est affirmé de façon définitive.

Enfin, certains patients présentant des mutations somatiques de RAS sur un progéniteur hématopoïétique ne développent pas de JMML mais une maladie auto-immune lymphoïde dont nous avons déjà parlé plus haut, le RALD.

(3) RAS Associated Lymphoproliferative Disease

Nous avons défini le RALD au début de cette introduction ; la partie suivante reprend l'ensemble des cas publiés dans la littérature ainsi que les formes limites entre JMML et RALD, puisqu'il a été publié récemment des cas de patients guéris de leur JMML et présentant à distance des stigmates d'auto-immunité¹⁶¹.

	145	159	159	160	160	160	160	281,282	283	284	284	284	161
	p58	Cas 1	Cas 2	Cas 1	Cas 2	P260		Cas 1	P1 ₁₆₁	Cas 3	Cas 4	Cas 9 ₁₆₁	Cas 6
									Cas 2			Cas 5	
Mutation	NRAS G13D	KRAS G13D	KRAS G13D	KRAS G13C	KRAS G12D	NRAS G13D	NRAS Q61P	KRAS G12S	NRAS G12D	KRAS G12S	NRAS G12S	NRAS G12S	NRAS G13S
Sexe	M	M	F	F	F			M	M	F	F	M	M
Age début	Précoce	9M	5M	4A	5A			11M	10M	4M	12M	10M	6M
ADP	+	+		+	+	+	+	+	-	-	-	-	+
SMG	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+
HMG		+	+			+	+	-	-	+	+	-	+
Autres	LLA Lymph.B				Erythème nouveau		Colite		Alopécie		Sd de Raynaud		
Auto immunité		Evans	Evans	Evans	Evans	AHAI	PTI		Lupus	PTI			Evans
Coombs GR	+	+	+	+	-								
Coombs Pqt		+	+	+	+								
Ac Anti PNN		+	+		+								
FAN	+	+	+	+	-			-	+	+	+	+	+
Anti-cardiolipine	+	+		+	+								
F. rhumatoïde	+			+	-						+		
Ac Anti PhosphL		+			+								
CD20	1678			586	497	élevé	élevé	494	697	658			
IgG	ND	élevé	élevé	élevé	élevé			élevé	élevé	Normal	élevé	Normal	élevé
Monocytes		760	510	850	1900	élevé	élevé	237	891	823	1342	342	380
Blastes m.		1,9	0,0					<3	0,0	<0,5	0,0	0,0	0,2
GB	9220	7600	5100	2620	4500	élevé	élevé	3400	8100	6100	6100	5700	8100
HbF	ND	0,6	1,9	ND	0,7	ND	ND	2,5	19	8,8	6,3	0,5	12
HSe Prog.		-	+					+	+	+	+	+	+
ACAD	Oui	Oui	Oui	Oui	ND	Oui	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
BIM	Oui	Oui	ND	Oui	ND	ND	ND	Oui	Oui	ND	Oui	Oui	Oui
Dernier TTT		Prednis olone	Grefe moelle	Décès 13A			Grefe 8A	13-cis RA	6-MP	aucun	aucun	aucun	6-MP

Tableau 6: Ensemble des cas de RALD, suspicions de RALD, LS-JMML présentant des stigmates d'auto-immunité publiés. ADP : Adénopathies, SMG : Splénomégalie, HMG : Hépatomégalie, LLA : Leucémie lymphoïde aigüe, Lymph.B : Lymphome B, GR : Hématies, Pqt : Plaquettes, Ac : Anticorps, PNN : Polynucléaires neutrophiles, FAN : Facteurs anti-nucléaires, F. : Facteur, PhosphL : Phospholipides, CD20 : Taux de CD20+ (Lymphocytes B) au phénotypage lymphocytaire, IgG : Taux de gammaglobulines, Blastos m. : blastose médullaire, GB : Leucocytes, HbF : Taux d'hémoglobine Foetale, Hse Prog. : Hyper-sensibilité des progéniteurs médullaires au GM-CSF, TTT : Traitement, A : ans, M : Mois, Sd : Syndrome, AHAI : Anémie hémolytique auto-immune, PTI : Purpura thrombopénique immunologique, 13-cisRA : 13-cis acide rétinoïque, 6-MP : 6-mercaptopurine.

Comme indiqué dans ce tableau, le diagnostic formel de RALD, à savoir une lympho-prolifération clinique avec adénopathies et splénomégalie éventuellement associée à des manifestations auto-immunes, ici un syndrome d'Evans – c'est à dire l'association d'une anémie hémolytique auto-immune à une thrombopénie auto-immune – chez des patients présentant une mutation de *NRAS* ou *KRAS* sur un hotspot et dont les lymphocytes T activés présentent un défaut d'ACAD en lien avec une diminution de BIM, n'a été posé que pour trois patients.

Un défaut d'ACAD sans preuve de diminution de BIM a cependant été rapporté chez deux autres patients présentant l'association clinique et génétique, et une diminution de BIM a pu être observée chez cinq patients atteints de formes atténuées de JMML ; quatre d'entre eux présentaient des stigmates biologiques voire cliniques d'auto-immunité, le cinquième ayant eu des adénopathies chroniques.

Enfin, un patient a présenté le tableau classique de RALD avec mutation, adénopathies, splénomégalies, syndrome d'Evans et auto-anticorps sans que les données expérimentales aient été disponibles pour confirmer le diagnostic de RALD et deux autres patients guéris de JMML peuvent entrer dans le tableau, à nouveau sans que les données expérimentales ne puissent le confirmer définitivement.

La description des ces treize cas nous fait suspecter que la frontière entre RALD et JMML n'est pas si nette et que les deux diagnostics ne sont pas nécessairement exclusifs. Etant donné cet état de faits, nous ne pouvons que conclure que les conséquences de l'hyperactivation de la voie RAS transmise par des progéniteurs hématopoïétiques peuvent être variables selon les individus. C'est pourquoi l'étude des conséquences de cette activité anormale de la voie RAS sur l'apoptose chez différents patients présentant les différents phénotypes nous a semblée intéressante et licite.

D. OBJECTIFS ET MÉTHODOLOGIE

Au cours de cette introduction nous avons mis en valeur l'importance du processus apoptotique dans la régulation de la prolifération lymphocytaire T suite à la stimulation antigénique et la complexité de son déroulement, liée aux nombreuses voies impliquées, pouvant de plus interagir entre elles.

Nous avons ensuite détaillé l'une de ces voies, la voie RAS, qui intervient également dans de nombreux autres processus cellulaires déclenchés par des signaux transmis via la signalisation membranaire, dont la prolifération et différenciation. La voie RAS semble être un pivot de la régulation apoptotique, cependant ses effets varient selon les types cellulaires et les stimuli reçus. Ainsi il nous a semblé qu'il était opportun d'approfondir notre connaissance du rôle des protéines RAS dans la régulation de la réponse immunitaire T.

Afin de progresser dans cette voie, nous nous sommes intéressés aux mutations activatrices de *RAS* dans le système hématopoïétique, en particulier celles qui sont jusqu'à présent décrites comme principal événement initiateur d'un processus malin, les mutations somatiques de *KRAS* et *NRAS* dans les JMML et RALD. En nous penchant sur ces deux pathologies, nous nous sommes tout d'abord étonnés du fait que les mêmes mutations soient à l'origine de phénotypes très distincts les uns des autres, partant de la pathologie bénigne auto-immune (RALD), passant par la leucémie indolente (LS-JMML) et allant jusqu'à la leucémie sévère (S-JMML).

Dans un premier temps, nous avons identifié un patient ayant présenté l'ensemble de ces phénotypes successivement et avons confirmé les données expérimentales pourvues par la littérature. Cependant, la succession de ces phénotypes chez un patient présentant cette mutation somatique de *KRAS*, ajoutant une variabilité intra-individuelle à la variabilité interindividuelle déjà décrite, nous a poussés à penser que des événements supplémentaires étaient en jeu.

Nous avons donc poursuivi en comparant la régulation de l'apoptose des patients atteints de RALD avec celle de patients atteints de JMML, sévère ou indolente. Là encore,

face aux différences, nous ne pouvions plus ignorer que d'autres événements, génétiques ou non, puissent être responsables de la différence entre les phénotypes observés et que de surcroît ces événements avaient un lien avec l'apoptose des lymphocytes T.

Par la suite nous nous sommes subséquemment attachés à identifier comment les lymphocytes T issus de patients porteurs de mutations activatrices de *KRAS* et *NRAS* effectuaient leur apoptose, et quels facteurs s'additionnant aux mutations de *RAS* modifiaient l'apoptose de ces cellules.

RÉSULTATS

II. RÉSULTATS

A. Article 1

RAS-Associated Lymphoproliferative Disease Evolves Into Severe Juvenile Myelo-Monocytic Leukemia

Blood. 2014 Mar 20;123(12):1960-3

Nina Lanzarotti, MD^{1,3}, Julie Bruneau, MD^{3,5}, Amélie Trinquand, MD^{6,7}, Marie-Claude Stolzenberg, PhD^{1,3}, Bénédicte Neven MD, PhD^{1,3,9}, Julien Fregeac^{1,3}, Eva Levy MD^{1,3}, Nadia Jeremiah^{1,3}, Felipe Suarez MD, PhD^{3,5,9}, Nizar Mahlaoui, MD^{3,9,10}, Alain Fischer^{1,3,8}, Aude Magerus-Chatinet, PhD^{1,3}, Hélène Cavé, PharmD, PhD^{11,12}, Frédéric Rieux-Laucat, PhD^{1,3*}

¹: Développement Normal et Pathologique du Système Immunitaire, Inserm U768, Hôpital Necker-Enfants Malades, Paris, France; ²: Département de Biothérapie, Hôpital Necker-Enfants Malades, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Paris, France; ³: Université Paris-Descartes, Sorbonne Paris Cité, Institut Imagine, Paris, France; ⁴: Service Anatomie et Cytologie pathologiques, Hôpital Necker-Enfants Malades, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Paris, France; ⁵: Cytokines, Hématopoïèse et Réponse Immune, CNRS UMR8147, Hôpital Necker-Enfants Malades, Paris, France; ⁶: Différenciation Lymphoïde Normale et Pathologique, CNRS UMR8147, Hôpital Necker-Enfants Malades, Paris, France; ⁷: Service d'Hématologie Biologique, Hôpital Necker-Enfants Malades, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Paris, France; ⁸: Unité d'Immuno-Hématologie et Rhumatologie Pédiatrique, Hôpital Necker-Enfants Malades, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Paris, France; ⁹: Service d'Immuno-Hématologie Adulte, Hôpital Necker-Enfants Malades, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Paris, France; ¹⁰: Centre de Référence des Déficits Immunitaires Héréditaires (CEREDIH), Hôpital Necker-Enfants Malades, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Paris, France; ¹¹: Département de Génétique, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Hôpital Robert Debré, Paris, France; ¹²: Université Paris-Diderot, Paris, France.

*: Corresponding author: Frédéric Rieux-Laucat, INSERM U768, Batiment Pasteur - Porte P2, Hôpital Necker-Enfants Malades, 149 rue de Sèvres, 75015 Paris-France, Phone: +33 1 44 49 50 82, Fax: +33 1 711 961 70, frederic.rieux-laucat@inserm.fr

Nous présentons avec cette publication un cas de RALD classique, tels qu'ils ont été décrits dans la littérature, à savoir un patient atteint d'une maladie auto-immune et lympho-proliférative bénigne à début précoce, pour lequel après avoir éliminé une mutation de *FAS* on a pu identifier une mutation somatique de *RAS*. Cette mutation somatique de *RAS*, présente dans toutes les populations lymphocytaires, était bien associée à une diminution de l'expression de BIM et un défaut fonctionnel d'ACAD.

Cependant, après splénectomie, ce patient a évolué vers une JMML lentement évolutive sur plus de dix années, ce qui n'a pas encore été décrit pour les autres patients étiquetés RALD, bien que le recul soit moins important pour ces autres cas.

Enfin, en quelques semaines, la JMML indolente s'est transformée en maladie agressive, infiltrant massivement les poumons du patient et entraînant son décès rapide. Ce tournant évolutif doit inciter les cliniciens à surveiller de près non seulement les patients étiquetés LS-JMML mais également ceux pour qui on a diagnostiqué une maladie dite bénigne, le RALD.

De plus, la succession des phénotypes pour un même patient démontre que l'on ne peut pas attribuer à certaines mutations un caractère bénin et à d'autres un caractère plus oncogénique. Ainsi la mutation de *KRAS G13C* à elle seule n'explique pas la variabilité observée et il est à présent nécessaire d'identifier les autres facteurs concourant à la physiopathologie de ce que l'on peut désormais désigner comme un continuum RALD – LS-JMML – S-JMML.

***RAS*-Associated Lymphoproliferative Disease Evolves Into Severe Juvenile Myelo-Monocytic Leukemia**

In Juvenile myelomonocytic leukemia (JMML), activating *RAS* mutations are responsible for a hyperactive *RAS*/ERK signaling (1). Somatic codons 12-13-61 *RAS* mutations are described in cases of *RAS*-associated lymphoproliferative disease (RALD) (2-4), believed to be a benign entity distinct from JMML. RALD features autoimmune cytopenias and lymphoproliferation secondary to a T-cell apoptosis defect, similar to Autoimmune Lymphoproliferative Syndrome (ALPS). In RALD the apoptosis defect is caused by a *RAS*/ERK-mediated down-regulation of the pro-apoptotic BIM protein (2-4), whereas in ALPS the defect is caused by mutations of the death receptor *FAS*(5). Thus the same oncogenic hematopoietic *RAS* mutations are associated with different phenotypes, considered as distinct pathologies. We report a case of G13C *KRAS* mutation firstly leading to RALD, then evolving from an indolent to an aggressive form of leukemia.

The patient presented with autoimmune hemolytic anaemia and thrombocytopenia, hepatosplenomegaly and multi-focal lymphadenopathy at age 5. He developed a clonal B-cell lymphoproliferation at age 7.5. At age 9.5 he underwent splenectomy and received four anti-CD20 infusions. From then on, the Evans syndrome declined and the leucocytes numbers rose. At age 20, he presented with chest pain and leucocytosis. The situation evolved into a fatal acute respiratory distress syndrome secondary to pulmonary leucostasis (Figure 1A).

The patient initially displayed classical RALD features. ALPS was ruled out after eliminating a *FAS* mutation. A somatic *KRAS* G13C mutation was found in all circulating hematopoietic cells subsets but not on primary derived fibroblasts (Figure 1B). Consistent with published data (2-4), BIM was down regulated in activated T-cells (Figure 1C) leading to an *in vitro* defect of activated-cell autonomous death (ACAD) (Figure 1D). Interestingly, lymph node histology showed Rosai-Dorfman-like features when biopsied at age 6, an aspect not yet described in RALD (Figure S1A-B-C).

After splenectomy, the patient started displaying classical JMML features with increasing peripheral myeloid cell numbers. In addition to ALPS features, the spleen showed an important immature myeloid colonisation (Figure S1D-E). The blood smear showed circulating dysplastic neutrophils and abnormal monocytes (Figure S1F-G). The bone marrow was hyper cellular with granulocytic hyperplasia without blast excess, at age 5 and 19 (Figure S1H-I). Spontaneous growth and hypersensitivity to GM-CSF of the bone marrow progenitors were found. Rearrangement of the *BCR-ABL* fusion gene was always negative. The JMML evolved during a 10 years period as a “long-survivor”, but the final stage was a classical feature seen in severe JMML (6).

Autoimmunity has been recently reported in spontaneous remission cases of JMML with persistent *RAS*-mutated clones (7). We now show that RALD can be the initial presentation of a severe JMML. Moreover, the patient’s history shows that one *RAS* mutation associates with the three different possible phenotypes (RALD, indolent and severe JMML). We thus postulate that RALD and JMML are not distinct entities but a continuum with additional genetic or epigenetic events contributing to the clinical phenotype and evolution. Therefore a close monitoring of such patients is recommended and further efforts are needed to elucidate the additional factors.

Supplementary information is available at Blood's website.

Acknowledgements:

This work was funded by grants from INSERM (to F.R-L.), the European Research Council (ERC PIDIMMUN N°249816) (to A.F.), Association pour la Recherche contre le Cancer (SFI20121205717) (to A.M-C.). This program has received a state subsidy managed by the National Research Agency under the « Investments for the Future » program bearing the reference ANR-10-IAHU-01 and IDEX Sorbonne Paris Cité (SPC/JFG/2013-031) (to F.R-L.). The authors are grateful to Prof L. Lament for providing the patient's biological specimen.

Authorship:

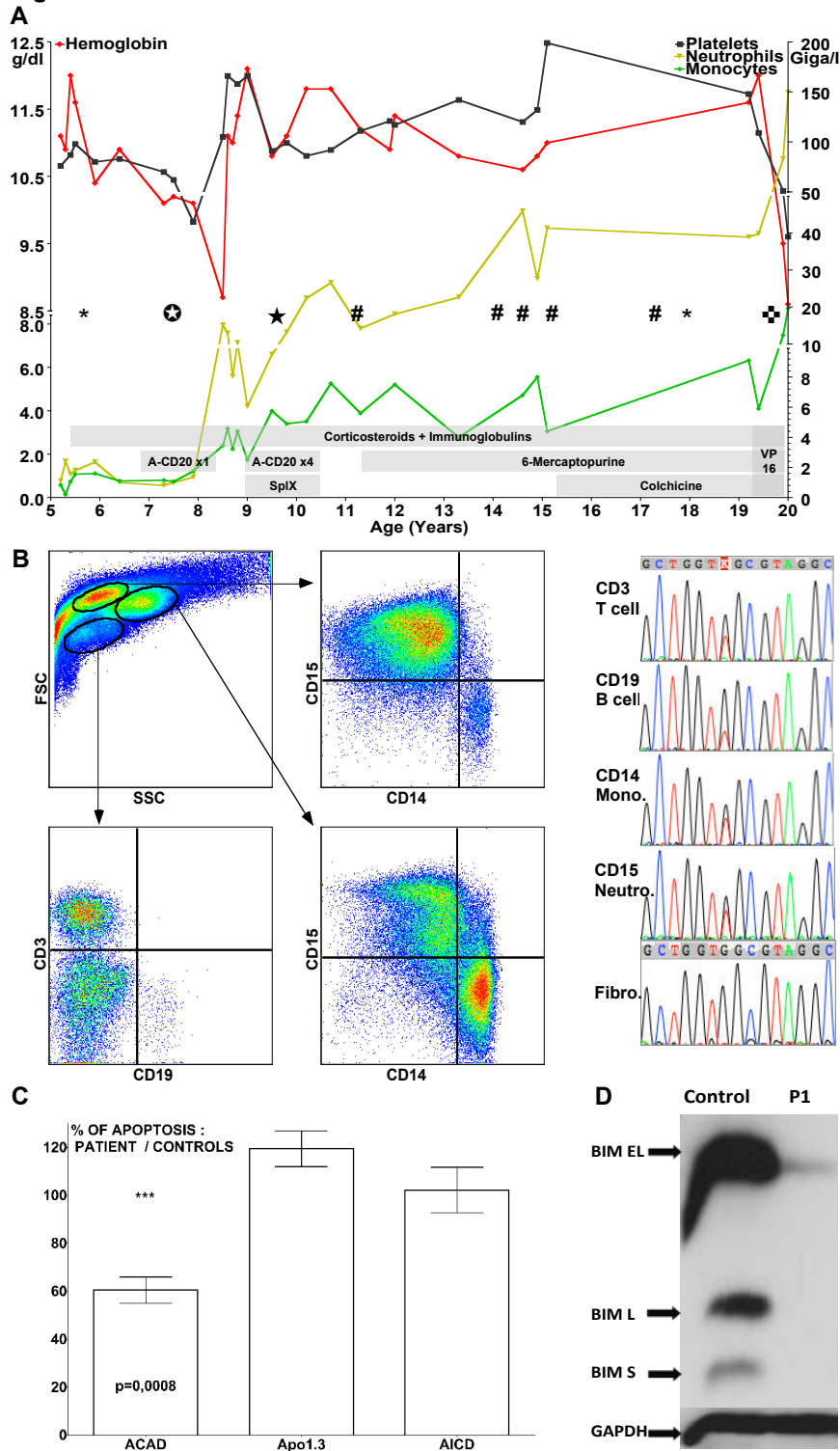
Nina Lanzarotti designed research, performed research, analyzed data, and wrote the paper. Julie Bruneau, Amélie Trinquand, Marie-Claude Stolzenberg performed research, analyzed data. Bénédicte Neven designed research, analyzed data. Julien Fregeac, Eva Levy, Nadia Jeremiah performed research. Felipe Suarez, Nizar Mahlaoui, Alain Fischer participated in clinical care. Aude Magerus-Chatinet designed research, analyzed data. Hélène Cavé, Frédéric Rieux-Laucat designed research, wrote the paper.

Conflict of interest statement:

The authors declare no conflict of interests.

References:

1. Shannon K, Li Q. Oncogenic Ras scales the ALPS. *Blood*. 10 march 2011;117(10):2747-2748.
2. Oliveira JB, Bidère N, Niemela JE, Zheng L, Sakai K, Nix CP, et al. NRAS mutation causes a human autoimmune lymphoproliferative syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 22 may 2007;104(21):8953-8958.
3. Niemela JE, Lu L, Fleisher TA, Davis J, Caminha I, Natter M, et al. Somatic KRAS mutations associated with a human nonmalignant syndrome of autoimmunity and abnormal leukocyte homeostasis. *Blood*. march 2011;117(10):2883-2886.
4. Takagi M, Shinoda K, Piao J, Mitsuiki N, Takagi M, Matsuda K, et al. Autoimmune lymphoproliferative syndrome-like disease with somatic KRAS mutation. *Blood*. march 2011;117(10):2887-2890.
5. Rieux-Laucat F, Le Deist F, Hivroz C, Roberts IA, Debatin KM, Fischer A, et al. Mutations in Fas associated with human lymphoproliferative syndrome and autoimmunity. *Science*. june 1995;268(5215):1347-1349.
6. Gustafsson B, Hellebostad M, Ifversen M, Sander B, Hasle H. Acute respiratory failure in 3 children with juvenile myelomonocytic leukemia. *J Pediatr Hematol Oncol*. dec 2011;33(8):e363-367.
7. Takagi M, Piao J, Lin L, Kawaguchi H, Imai C, Ogawa A, et al. Autoimmunity and persistent RAS-mutated clones long after the spontaneous regression of JMML. *Leukemia*. sept 2013;27(9):1926-1928.

Figure 1**Figure 1 A: Hematobiological evolution of the patient with treatment courses.**

SplX: Splenectomy, VP16@: Etoposide, A-CD20: Rituximab, *: Pneumopathy, ☆: Colic B cell proliferation, ★: Evans syndrome aggravation with spleen enlargement crisis and circulating B cell proliferation, #: Pericarditis associated to arthritis, ✚: Acute myeloproliferation with pulmonary infiltration leading to death. B: Cell sorting and sequencing of circulating leucocytes populations and primary derived fibroblasts. Fibro: fibroblasts, Neutro.: neutrophils, Mono.: monocytes. C: *In vitro* apoptosis assays on superantigen stimulated T-cells from the patient, results are compared to controls : ACAD: Activated Cells Autonomous Death, using cytokines withdrawal, Apo1.3: direct Fas stimulation with an agonist antibody, AICD: Activation Induced Cell Death by T-cell Receptor restimulation. D: Western Blot of patient's (P1) Bim expression on activated T-cells.

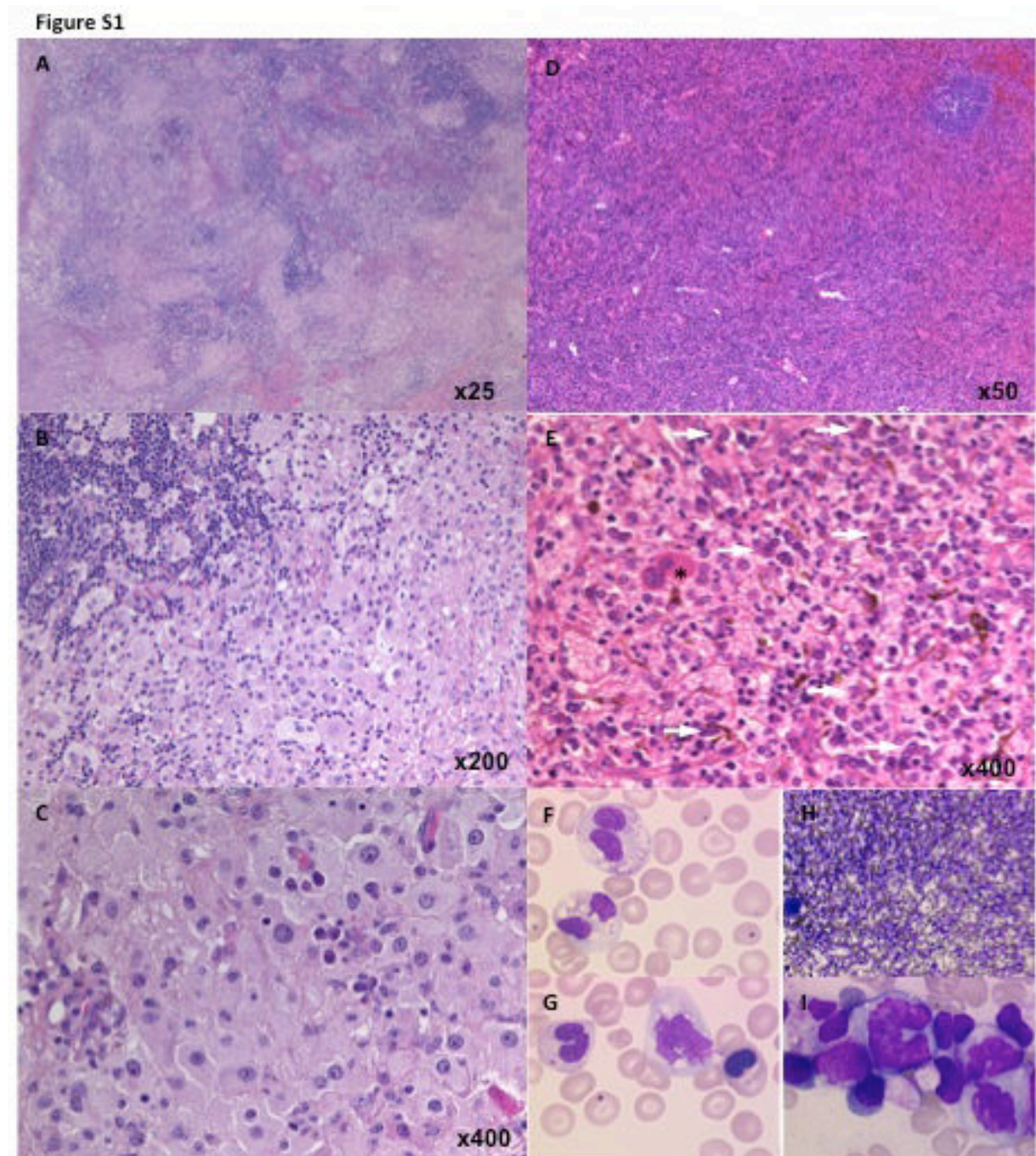


Figure S1:A-B-C: Lymph node architecture modified by hypoplastic follicles and massive sinus histiocytosis. Histiocytes consisted of large macrophages with abundant and eosinophilic cytoplasm. Pictures of emperipolesis were rare. **D-E: Spleen:** Abnormal architecture with white pulp hypoplasia and red pulp hyperplasia with moderate haematopoiesis (*). Increase of plasma cells into the red pulp (arrows). **F-G: Blood smear** smear with mature dysplastic neutrophils (cytoplasmic hypogranularity and bilobed nuclei), abnormal monocytes, Howell-Jolly bodies in erythrocytes and erythroid precursor. **H-I: Bone marrow smear:** hypercellularity with granulocytic proliferation, monocytes infiltration, dysgranulopoiesis, dyserythropoiesis and no excess of blasts.

B. Article 2

Apoptosis Discriminates Between Mild And Severe RAS Mutated Juvenile Myelo Monocytic Leukemia

En cours de soumission **EMBO Molecular Medicine**

Nina Lanzarotti, MD, PhD^{1,3}; Aude Magerus-Chatinet, PhD^{1,3}; Marie-Claude Stolzenberg, PhD^{1,3}; Aurélie Caye, PharmD^{4,5}; Eva Levy, MD^{1,3}; Nadia Jeremiah^{1,3}; Patrick Villarese⁶; Bénédicte Neven, MD, PhD^{1,3,7}; Marion Strullu, MD^{4,5}; Alain Fischer, MD, PhD^{1,3,7}; Hélène Cavé, PharmD, PhD^{4,5}; Frédéric Rieux-Laucat, PhD^{1,3*}

¹: INSERM UMR 1163, Immunogenetics of pediatric auto-immunity, Institut Imagine, Paris, France; ²: Département de Biothérapie, Hôpital Necker-Enfants Malades, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Paris, France; ³: Université Paris Descartes-Sorbonne Paris Cité, Institut Imagine, Paris, France;⁴: Université Paris-Diderot, Sorbonne Paris Cité, Paris, France;⁵: Département de Génétique, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Hôpital Robert Debré, Paris, France.⁶: Université Paris Descartes, Département d'hématologie, CNRS UMR 8147, Hôpital Necker-Enfants Malades, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Paris, France;⁷: Unité d'Immuno-Hématologie et Rhumatologie Pédiatrique, Hôpital Necker-Enfants Malades, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Paris, France;

*: Corresponding author: Frédéric Rieux-Laucat, INSERM UMR 1163, Institut Imagine, 24 boulevard du Montparnasse, 75015 Paris-France, Phone: +33 1 44 49 50 82, Fax: +33 1 711 961 70, frederic.rioux-laucat@inserm.fr

Nous présentons dans cet article l'étude de l'apoptose de patients présentant les trois phénotypes pouvant résulter de mutations oncogéniques activatrices de *RAS* dans la lignée lympho-myélocytaire mature.

Alors que l'ACAD, qui n'a été jusqu'à présent étudiée que chez des patients atteints de RALD, est normale chez les patients atteints de JMML, l'AICD, qui auparavant n'avait jamais été étudiée chez des patients porteurs de ces mutations, est défectueuse uniquement chez les patients avec un phénotype sévère.

Nous montrons ainsi que la mutation de *RAS* seule ne suffit pas à entraîner une diminution de BIM et un défaut d'ACAD. Nous montrons de plus que des événements additionnels interviennent, qui ont une influence sur l'apoptose et l'homéostasie lymphocytaires et sont déterminants dans l'évolution péjorative de la myéloprolifération.

Ces événements qui entraînent un défaut d'AICD permettant de faire la différence entre LS-JMML et S-JMML ont une influence sur l'apoptose dépendante des caspases. Ainsi, soit les caspases ne peuvent plus être clivées, soit lorsque clivées elles ne sont pas capables d'induire l'apoptose.

Nous avons éliminé des mutations des caspases et de leurs protéines régulatrices, ainsi qu'une dérégulation de la transcription de ces dernières. Nous avons mis en évidence des modifications post-traductionnelles des protéines régulatrices des caspases, dont la cause qui reste encore à identifier semble unique à chaque cas.

En attendant d'identifier les facteurs additionnels responsables des résultats obtenus, la confirmation à plus grande échelle du défaut d'AICD dans les cas sévères est nécessaire. Elle pourra aboutir à l'émergence d'un outil pronostique efficace qui pour l'instant fait défaut et permettrait d'éviter une greffe de moelle osseuse dans les cas de bon pronostic.

Apoptosis Discriminates Between Mild And Severe *RAS* Mutated Juvenile Myelo Monocytic Leukemia

Abstract

Juvenile Myelo Monocytic Leukemia (JMML) is a rare but particularly aggressive myelo-dysplastic and myelo-proliferative neoplasm of early childhood. Hyper activating mutations of the RAS pathway lead to this aggressive disease for which hematopoietic stem cell transplantation is the only known curative treatment. However, cases of spontaneous improvement in patients called long survivors have been described, as well as autoimmune benign diseases (RALD) in some patients carrying *NRAS* or *KRAS* mutations in their T-cells. We describe six patients with JMML carrying *NRAS* or *KRAS* mutations. One patient has a RALD, two patients are JMML long survivors whereas the three others have an aggressive disease. *In vitro* apoptosis functional assays and biochemical profiles show distinct biological phenotypes discriminating the groups of patients. We thus propose that there are modifying factors that influence T-cells apoptosis and are responsible for the severity of JMMLs associated to *NRAS* or *KRAS* hematopoietic stem cell mutations. The underlying mechanisms to the apoptosis defects can be a specific target for new treatments and an alternative to hematopoietic stem cell transplantation.

Keywords

Apoptosis, Autoimmunity, Leukemia MyeloMonocytic Juvenile, Lymphocyte, RAS

Introduction

Juvenile myelo-monocytic leukemia (JMML) is a rare but particularly aggressive chronic myelo-proliferative and myelo-dysplastic neoplasm of early childhood (1). It is a hematopoietic stem cell (HSC) disease characterized by an excessive production of myeloid and monocytic cells that infiltrate vital organs (2). The only known curative treatment is hematopoietic stem cell transplantation (HSCT) following intensive myelo-ablative chemotherapy with only 24-54% of event free survival and a high relapse rate (3). The pathogenesis of JMML relies on a hyperactive RAS-signaling induced Mitogen Activated Protein Kinase (RAS/MAPK) pathway in hematopoietic lineage, due to mutually exclusive initiating mutations in *PTPN11*, *NRAS*, *KRAS*, *NF1*, *CBL* (4). Moreover, patients with genetic conditions associated with RAS pathway overactivation such as type-1 neurofibromatosis or Noonan syndrome are prone to developing JMML. Accordingly, unlike what is observed in other tumors, RAS pathway mutations are considered to be the initiating event in JMML, making it a unique model of RAS-driven oncogenesis.

Despite this common underlying mechanism related to the RAS pathway, a broad clinical phenotype is observed among patients with JMML. This variability cannot be solely explained by the RAS-pathway mutation. Some patients present with mild or self-resolving JMML, referred to as long-survivors (LS-JMML) (5–9) whereas other patients with the same mutations develop aggressive forms of JMML (5,10,11). Intriguingly, a few cases of patients have been recently reported with somatically acquired mutations in *NRAS* or *KRAS* and features shared between JMML and Autoimmune Lympho Proliferative Syndrome (ALPS). This benign autoimmune condition has been considered to form a new disease named Ras-associated Autoimmune Lympho-proliferative Disease (RALD) (12–15). We recently reported the case of a patient with ALPS features associated with a *KRAS* mutation who eventually developed a severe JMML at 20 years (15). Such a case suggests that there could be a continuum between these clinico-biological entities. However, the pathophysiological bases accounting for the variability between the phenotypes induced by HSC activating *NRAS* or *KRAS* mutations (aggressive or LS-JMML, RALD) remain unknown.

ALPS is a disorder associated with a defect of apoptosis in T lymphocytes. Apoptosis in antigen-triggered T cells follows two major mechanisms: activated-cells autonomous death (ACAD) and activation induced cell death (AICD). Under homeostatic conditions, ACAD is triggered by the deprivation of co-stimulating factors such as cytokines (Interleukin 2, IL2). It signals through the mitochondrial apoptotic pathway via BIM and others proteins of the BCL2 family and allows the termination of the immune response. The autoimmunity observed in RALD patients was explained by the unchecked ERK phosphorylation due to RAS hyperactivity. This results in BIM down regulation leading to an ACAD defect that prevents the termination of the ongoing immune response (12–15). AICD is initiated by repeated or chronic antigen stimulation. It induces the extrinsic apoptosis pathway mainly through the death receptor FAS (16). It also induces the mitochondrial pathway via BIM and granzyme B (17,18). The AICD pathway controls the immune response in terms of duration and intensity whereas the ACAD pathway ensures its termination (19). Both pathways are important in controlling proliferation of aberrant cells and can be involved in hematopoietic malignancies.

Interestingly, activated T lymphocytes of RALD patients show a defect of ACAD. Even though JMML is a myelo-monocytic disorder, several lines of evidence imply that it arises from a pluripotent HSC. For instance, EBV cell lines were shown to be mutated in some patients (20) and B-lineage acute lymphoblastic leukemia or T-cell lymphoma transformations have been reported in JMML patients (21,22). Although JMML might be a heterogeneous disease regarding the progenitor in which the mutation originates (23,24), the presence of the *NRAS* or *KRAS* mutation in peripheral T-cells of JMML patients was recently reported in several cases of spontaneous improvement and associated autoimmunity, that seemed to be intermediary forms between LS-JMML and RALD (9).

Altogether, these observations make T-cells apoptosis defect a potentially interesting factor that could be involved in JMML pathogenesis. Further characterization of the molecular mechanisms involved in the T-cell response in *NRAS* or *KRAS* mutated patients could help better understanding the *NRAS* or *KRAS*-driven leukemogenesis. Therefore, our aim was to explore whether defects in these apoptosis pathways were

identical or different within the various phenotypes induced by pluripotent HSC *NRAS* or *KRAS* mutations.

Here we explored the apoptosis function in five cases of *NRAS* or *KRAS* mutated JMML patients and one case of *KRAS* mutated RALD (15) as compared with controls. We report their biological data with particular emphasis on lymphocyte homeostasis and the results of performed functional *in vitro* apoptosis assays, triggering either the intrinsic or extrinsic apoptosis pathways with ACAD and AICD. Interestingly, our results show abnormal apoptosis function only in RALD and in severe JMMLs. We show that AICD defects with abnormal caspases function could account at least in part for the clinical spectrum observed in case of *NRAS* or *KRAS* mutations in HSC. Remarkably, apoptosis defects seem not to be necessarily linked to the mutation itself.

Results

NRAS or KRAS mutated patients and lymphoid compartment

Five patients with *NRAS* or *KRAS* mutations and JMML were included in the study. Patients P2 and P3 had a LS-JMML phenotype whereas patients P4, P5 and P6 had a severe phenotype. Patient P1 presented a RALD phenotype and was previously described (15). The patients' biological findings and history are summarized in Table 1 and Figure S1. In addition to the classical anomalies observed in JMML patients (such as high neutrophil counts and monocytosis), abnormally high circulating immunoglobulin levels were observed suggesting abnormal B-cells activation in all patients except P4. Moreover, absolute lymphocyte counts were elevated only for the severe JMML patients (P4, P5 and P6), whether it was B-cells in P4 and P5 or T-cells in P6. These findings indicate a defect of lymphocyte homeostasis. As such perturbations can be related to an apoptosis defect, we thought that lymphocytes' apoptosis function evaluation was a relevant function to be assessed in JMML patients' T-cells.

ACAD defect and down-regulation of BIM are specific to RALD

As ACAD is defective in RALD patients' T-cells, we assessed it in JMML patients' T-cells. Contrary to the T-cells in the RALD patient (P1), none of the five JMML patients' T cells showed a diminution of *in vitro* ACAD (at least 25% less than controls) (Figure 1A). Accordingly, none of the five patients' lymphocytes showed a down regulation of BIM expression in quite contrast with the RALD patient (Figure 1B) and BIM was even over expressed in P5 and P6 (Figure S2). This suggests that the BIM pathway is functional in the JMML patients.

AICD defect is specific to severe JMML

As ACAD was normal and didn't account for lymphocytes' abnormal homeostasis, we then assessed the AICD in the JMML patients' T-cells (Figure 2A). It was significantly reduced in the T-cells from the three patients with a severe form of JMML (P4, P5 and P6). A defect of more than 65% is measured in T cells from P4 and P5 as compared with controls. In contrast, the AICD of T-cells from patients with RALD or LS JMML was not impaired. Potential causes of impaired AICD such as a lack of Fas Ligand expression or a Fas-induced apoptosis defect had been previously ruled out (Figure S3).

AICD defect is specific to severe JMML and due to altered caspases cleavage and function

To further explore the AICD defect in the severe JMML patients, we looked at the caspase signaling through the detection of the cleaved as well as uncleaved forms of caspase 8 (initiating caspase) and caspase 3 (effector caspase) (Figure 2B). The cleavage of caspases 3 and 8 was normal for P2 (a LS-JMML patient with normal T-cells AICD) when compared to controls. In contrast, in T-cells from a severe JMML patient with a profound AICD defect (P4), we could not detect cleaved forms of caspases 3 and 8, but we observed overabundance of the full forms of these caspases. Whereas T-cells from P5 and P6 (who also developed severe JMML) exhibited a profound AICD defect, the cleaved forms of caspases 3 and 8 were over expressed as compared to controls (Figure 2B). Since over expression of the cleaved caspases did not lead to apoptosis in P5 and P6, we suspected a defect in their enzymatic activity. This function was assessed by looking at caspase 3 dependent cleavage of PARP in P5 and P6. We observed a reduction in PARP cleavage in their AICD stimulated T-cells as compared to controls and LS-JMML T-cells (Figure 2C). Thus, the AICD defect observed in activated T lymphocytes from patients with severe JMML was related to an impaired caspase cleavage in P4 and an impaired activity of the cleaved caspases in P5 and P6. Direct T-cells DNA sequencing of genes encoding apoptosis inducing molecules (such as FADD, caspases 3, 8 and 10) did not reveal any abnormalities for any of the patients. We thus undertook an analysis of the expression of potential caspase inhibitors. Indeed, these observations were consistent with the over-expression of the inhibitory apoptosis proteins cIAP1 and 2 for P4 and cIAP2 only for P5 and P6 (Figure 2D). Direct DNA sequencing of the IAPs regulators genes *HTRA2* and *SMAC* was normal for these two patients. As cIAP2 and XIAP have been reported to be up-regulated by RAS in intestinal epithelial cells (25), we tested XIAP expression that was found normal for all the patients (Figure 2D).

Abnormal apoptosis is not due to transcription modifications

Profiling of the apoptosis genes expression with Taqman low density assay was performed on activated T cells undergoing AICD for P4 and P5 and compared to matched controls (Figure 2E). The majority of the genes showed minor to no changes in mRNA expression. Furthermore, the few significant differences between patients and control were the up regulation of pro-apoptotic genes of the mitochondrial apoptosis

pathway that did not lead to an increased apoptosis, indicating that the abnormal apoptosis was not secondary to abnormal transcription.

Apoptosis status is not related to the proportion of NRAS or KRAS-mutated T lymphocytes

The *NRAS* or *KRAS* somatic mutations were detectable in PBMCs from all patients. In P1 (15), P2 and P3, these mutations were also detectable in T cells (Figure 3A). Thus, the normal *in vitro* AICD was not related to a loss of the mutated T-cells in the LS-JMML patients. Nevertheless, the mutated peak was diminished in T cells from P4 and was absent in P6's T-cells. To determine the percentage of mutated T cells in P4 we sub-cloned the PCR products obtained from activated T cells. Colonies counts showed that 100% of the activated T cells carried the mutation in P2, but only 20% carried the mutation in P4. Thus, the *NRAS* or *KRAS* mutation was undetectable in P6, detectable with heterozygous aspect in P5 and found in 20% of P4 T-cells. Therefore the apoptosis defect in the severe JMML patients was not correlated with the detection of the *NRAS* or *KRAS* mutations in T-cells.

Apoptosis status is not related to the level of RAS activation in T lymphocytes

To further explore the consequences of a partially *RAS* mutated population of T cells in the AICD defect and BIM regulation, we performed a RAS pull down assay. Even though no *NRAS* mutated activated T cells were found in P6, its level of active RAS was still high. P2, P3 and P5 all had more active RAS than the controls (Figure 3B). As both LS-JMML and S-JMML displayed high levels of active RAS, the AICD, only defective in S-JMML patients, was independent from the RAS activation.

BIM expression is independent from ERK phosphorylation

In the previously described RALD cases including P1, the down regulation of BIM was thought to be the consequence of an excessive ERK phosphorylation. We thus assessed this biochemical feature in the present JMML patients. Surprisingly, the ERK phosphorylation was increased in P2, P3 and P4 T-cells which all had a normal BIM expression or even a higher expression than controls (Figure 3C). Moreover, even though P5 and P6 had levels of ERK phosphorylation comparable to controls, P6 had still an increased BIM expression. Thus, in these five JMML patients, the regulation of BIM was independent from ERK phosphorylation.

Discussion

RALD patients with an ACAD defect and / or a BIM down regulation have been described in five independent reports (9,12–15). Since these changes in apoptosis signaling following the *NRAS* or *KRAS* mutations were reported as the cause of the autoimmune symptoms, it was necessary to assess the apoptosis status of patients carrying the same mutations but without any clinical manifestation of auto-immunity. In our cohort, six patients presented with the three different phenotypes that can be observed with HSC *NRAS* or *KRAS* mutations: RALD, LS-JMML and severe JMML. Even though only P1 had autoimmune symptoms, the severe *NRAS* or *KRAS* mutated JMML patients P4, P5 and P6 exhibited increased cell counts in the lymphoid compartment indicating a deregulation in lymphocyte homeostasis.

Furthermore, the *in vitro* lymphocyte apoptosis, a key checkpoint of immune homeostasis, was different within the patients and correlated with the clinical phenotypes. Indeed, as the RALD patients T-cells display an ACAD defect, this does not hold true in LS-JMML patients. In striking contrast, a previously not described AICD defect was observed in severe JMML patients' T-cells. The protein expression pattern was also different within the patients and correlated with the apoptosis status. We thus show that three different clinical phenotypes are related to three different *in vitro* functional apoptosis profiles.

Moreover, whereas the RALD patients T-cells exhibit a down regulation of BIM leading to an ACAD defect and thus an abnormal control in terminating an immune response, the two LS-JMML patients P2 and P3 had normal BIM expression and accordingly no ACAD defect. However, all of their T-cells carried the *NRAS* mutation, high levels of active RAS were detected and an increased ERK phosphorylation was observed. These results suggest that *NRAS* or *KRAS* mutation associated with increased RAS and ERK activity in T-cells as expected. However, these biochemical events are not correlated with an ACAD defect nor with a BIM modulation. We thus hypothesize that in RALD an additional event might be necessary to trigger the apoptosis defect.

In all the three severe JMML patients studied, an AICD defect was observed in T-cells, as a consequence of either a defective caspase cleavage or caspase activity. The defective cleavage of initiator caspases such as caspase 8 cannot be explained by a FLIP over expression as it was found normal in the patients' T-cells. The caspase activity defect is consistent with a lack of cIAPs down-regulation after apoptosis stimulation. Nevertheless the abnormal caspase profile did not impair ACAD nor the FAS-induced apoptosis. These observations are indicating that BIM as well as FAS-dependent apoptosis are likely independent from the caspase activation or activity. This was previously demonstrated in cancer cells and in normal T-cells (26,27). The AICD defect was independent from the proportion of *NRAS* or *KRAS* mutated T-cells strongly suggesting the existence of additional factors influencing apoptosis besides the *NRAS* or *KRAS* mutation. No mutations were found in the genes encoding for neither the abnormally functioning or expressed proteins nor their regulators. Thus, the events leading to these biochemical and functional profiles, genetic, epigenetic or post-translational still need to be elucidated. Given that the apoptosis defects levels are different (caspases activation in P4 and caspases activity in P5 and P6) it is likely that the corresponding unforeseen causes are also different for each patient. But interestingly enough they all affect the AICD pathway. In RALD the down-regulation of BIM is the cause of the ACAD defect that leads to auto-immunity and lymphoproliferation. We propose that in severe JMML the AICD defect can be at play in the aggressiveness of the disease. Indeed, AICD defects lead to an abnormal regulation of the immune response to chronic and repeated antigenic stimulation, which might also be necessary to check malignant proliferation. Furthermore, the apoptosis defects detected in the severe JMML patients' T-cells need to be explored in the myeloid lineage, as the same defects in monocytes and / or neutrophils could also participate to the disease's severity.

It can be argued that the modifying factors responsible for either an auto-immune phenotype, a mild or severe JMML could be the differences between the codons and amino-acid changes within the *NRAS* or *KRAS* mutations. But for each mutation associated to a RALD or a mild JMML phenotype, cases of severe JMML have already been described and vice versa (5,8–11). Moreover, we show that even with less than 20% of *NRAS* or *KRAS* mutated T-cells the AICD defect is still detectable. A transfer of the

RAS activated proteins from one cell to others is another possibility (28). However, the *NRAS* or *KRAS* mutation was present in all the T-cells of the patients with LS-JMML with high levels of active RAS and no AICD defect was detectable. We thus conclude that the modifying factors are independent from the *NRAS* or *KRAS* mutation. Finding these factors is crucial as specific treatments could improve the prognosis and be an alternative to HSCT for the patients.

In conclusion, we used T cells apoptosis profiles to differentiate the distinct clinical outcomes resulting from somatic activating *NRAS* or *KRAS* mutations in pluripotent HSCs. Surprisingly enough, there seems to be a role for T-cells apoptosis in controlling the myeloid proliferation in a myelo-monocytic disease. Additional events impairing AICD through caspases malfunction could thus act in cooperation with the *NRAS* or *KRAS* mutation leading to a severe disease. These results need to be confirmed on a larger scale. Further understanding of the modifying factors related to immune regulation and apoptosis would allow the development of more efficient treatment strategies in JMML.

Supplementary information is available at EMBO Molecular Medicine's website.

Materials and methods

Patients

Six patients with a somatic RAS mutation were included in the study. Patient 1 had a RALD that eventually turned into an aggressive JMML at age 20 years and has been reported in details (15). Patients 2 to 6 had a JMML fulfilling the JMML consensus criteria (29). Endogenous myeloid progenitor cell growth and genotyping were performed as previously described (29). All patients had Immunoglobulin dosage at diagnosis. Endogenous myeloid progenitor cell growth was evidenced in all 6 patients. Patients' clinical and biological data are available in Table 1 and Figure S1. All patients, or their parents or guardians were provided written informed consent, validated by the Ethics Committee from INSERM, in accordance with the Declaration of Helsinki.

Isolation and fractionation of lymphocytes

Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were isolated from heparinized blood samples by density gradient centrifugation (Lymphoprep; Abcys, Paris, France) and stored frozen in DMSO until used.

Activation-induced cell death and activated cells autonomous death sensitivity

The AICD experiments were conducted on T cells from the 6 patients and 3 different controls. PBMCs were activated by 0,1µg/mL of staphylococcal enterotoxin E (SEE; Toxin Technology, Madison, WI) in Panserin medium (Dutscher, Brumath, France) completed with 5% of heat-inactivated pooled human serum from rhesus AB donors (EFS, Rungis, France), 100 U/ml of penicillin 100mg/ml of streptomycin and 2 mM of glutamine. At day 3, dead cells were removed by density gradient centrifugation. T cells were then maintained in 100 U/mL of human recombinant interleukin (IL)-2 until day 21. Fresh medium was added every 48 hours. For induction of AICD, $2 \cdot 10^5$ activated T cells from day 9 to 21 were restimulated in the presence of 100 U/mL of IL-2 for 18 hours, with 0,1 and 0,01µg/mL of soluble SEE, in 96-well round-bottom plates. For induction of ACAD, day 9 activated T cells were washed thrice in phosphate buffered saline (PBS) and put back to culture without IL2.

Apoptosis detection

Cell death was determined as the percentage of hypodiploid-nuclei (HN) assessed by propidium iodide staining: as previously described(30). The percentage of induced apoptosis was calculated as $100 \times [\text{percentage of experimental HN} - \text{percentage of spontaneous HN}] / [100 - \text{percentage of spontaneous HN}]$. Calculated apoptosis was then compared to the control, and was considered reduced if at least inferior to 75% of the control.

Flow cytometry

Cultured T cells SEE activated at day 9 to 21 were pelleted following TCR re-stimulation (4 hours), washed twice in PBS, incubated with antibodies : CD4 FITC (SK3-SK4, BD) CD8 Viogreen (BW135/80, Miltenyi) TCRab PC5 (IP26, Biolegend) FAS PECy7 (DX2, Biolegend) for 30 minutes on ice and in obscurity, washed twice in PBS, permeabilised with ebioscience fix/perm kit following manufacturer's instructions, washed in Perm buffer, incubated with FAS-LIGAND PE (MFL3, BD Pharmingen) or isotype (Armenian Hamster IgG1k) for 1 hour, washed and resuspended in perm buffer. Nuclei and cells were analysed on MACS-Quant instrument using Flowjo software.

Western blot analysis

Proteins were extracted from 4 million activated T cells in standard radioimmunoprecipitation assay buffer supplemented with protease and phosphatase inhibitors. Lysates were resolved with 8 to 12% SDS-PAGE and transferred onto a polyvinylidene difluoride membrane (Immobilon P; Millipore SAS, Molsheim, France). BIM protein was detected by using over night incubation with a rat anti-human BIM antibody (clone 3C5). Caspase-3 (Rabbit IgG clone 8G10, Cell signaling technology), caspase-8 (Mouse monoclonal IgG2bk clone 5F7, MBL international), PARP (Rabbit IgG clone 46D11, Cell signaling technology), cIAP1 (Mouse IgG1 clone F-4, Santa cruz biotechnology), cIAP2 (Mouse IgG1k clone F30-2285, BD Pharmingen), XIAP (Mouse IgG1 clone 28/hILP/XIAP, BD Transduction Laboratories), Phospho-p44/42 ERK1/2 – Thr202/Tyr204) (Rabbit IgG clone D13.14.4E, Cell signaling technology) and appropriate secondary HRP-linked antibodies were used according to the manufacturers instructions. The immunoblot was developed using the ECL Plus Western Blotting Detection System (GE Healthcare, Velizy, France). After stripping, the membranes were

probed with a rabbit anti-human glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase antibody (clone 14C10).

RNA isolation and Taqman

RNA was isolated from activated T cells following TCR re stimulation challenge by using the RNeasy mini kit by Qiagen and following manufacturer's instructions. Taqman Low Density Array was then performed using microfluidic apoptosis cards from Life biotechnologies, ran on an Applied Biosystem 7900HT Fast Real-Time PCR system and analysed with SDS software.

DNA isolation and sequencing

DNA was isolated from PBMCs and activated T cells by using standard methods (proteinase K digestion and phenol-chloroform extraction). The RAS gene's exon 2 was amplified and sequenced according to standard methods.

TOPO TA Cloning

Subcloning and transforming was performed on TOP10 chemically competent bacteria provided with the TOPO TA cloning kit from Invitrogen and used according manufacturer's instructions.

Active RAS pull down and detection assay

Was performed on SEE activated T cells following Perbio Sciences' instructions.

Statistical analysis

The unpaired Student *t* test was performed using Prism software (GraphPad Software, San Diego, CA).

Acknowledgements:

We thank Drs M Poirée (CHU Nice), Y Reguerre (CHU angers), JH Dalle (Robert Debré university hospital), and Y Bertrand (IHOP, Lyon) for sending samples from their patients. This work was funded by grants from INSERM (to F.R-L.), the European Research Council (ERC PIDIMMUN N°249816) (to A.F.), Association pour la Recherche contre le Cancer (SFI20121205717) (to A.M-C.). This program has received a state subsidy managed by the National Research Agency under the « Investments for the Future » program bearing the reference ANR-10-IAHU-01 and IDEX Sorbonne Paris Cité (SPC/JFG/2013-031) (to F.R-L and HC.).

Authors' contributions:

Nina Lanzarotti designed the study performed experiments analysed data wrote the paper

Aude Magerus-Chatinet was involved in the design of the project, setting up experiments and analysed data

Marie-Claude Stolzenberg was involved in setting up the experiments, performed experiments

Aurélie Caye collected clinical and biological data

Eva Levy performed experiments, analysed data

Nadia Jeremiah performed experiments

Patrick Villarese analysed data

Bénédicte Neven was involved in the design of the project and analysis of clinical data

Alain Fischer was involved in the design of the project and analysis of clinical data

Hélène Cavé designed and supervised the study, analysed data, wrote the paper

Frédéric Rieux-Laucat designed and supervised the study, analysed data, wrote the paper

Conflict of interest statement:

The authors declare no conflict of interests.

The paper explained

PROBLEM:

In spite of our current knowledge of the causative aberrant signaling pathway in juvenile myelo-monocytic leukemias, the RAS/MAPK pathway, we cannot explain the broad clinical spectrum in the case of hematopoietic stem cells *NRAS* or *KRAS* mutations. In these cases, the myelo-monocytic disease can be mild or severe, or associated to a lymphoid disease due to the presence of the mutation in T-cells. A better understanding of leukemogenesis according to the genetics and clonal architecture of JMML is thus necessary. As in the cases with lymphoid disease the T-cells apoptosis is abnormal and *RAS*-mutated T-cells have been described in JMML, further study of such pathway is relevant.

RESULTS:

We performed *in vitro* functional apoptosis assays on activated lymphocytes from patients with three different outcomes of HSC *NRAS* and *KRAS* mutations. We identified three distinct apoptotic profiles. *NRAS* or *KRAS* mutations leading to a lymphoid disease are associated to a defect of termination of the immune response. *NRAS* or *KRAS* mutations leading to a severe leukemia are associated to a defect of control of the immune response to repeated and chronic antigen stimulations. *NRAS* or *KRAS* mutations leading to a long survivor form of leukemia do not modify the apoptotic control of the immune response.

IMPACT:

We propose that there are modifying factors that influence T-cells apoptosis and are responsible for the severity of the JMML. The underlying mechanism to the apoptosis defects can be a specific target for new treatments and an alternative to hematopoietic stem cell transplantation.

References:

1. Chang TY, Dvorak CC, Loh ML. Bedside to bench in juvenile myelomonocytic leukemia: insights into leukemogenesis from a rare pediatric leukemia. *Blood*. 27 août 2014;
2. Chan RJ, Cooper T, Kratz CP, Weiss B, Loh ML. Juvenile myelomonocytic leukemia: a report from the 2nd International JMML Symposium. *Leuk Res*. mars 2009;33(3):355-62.
3. Yoshimi A, Kojima S, Hirano N. Juvenile myelomonocytic leukemia: epidemiology, etiopathogenesis, diagnosis, and management considerations. *Paediatr Drugs*. 2010;12(1):11-21.
4. Niemeyer CM, Kratz CP. Paediatric myelodysplastic syndromes and juvenile myelomonocytic leukaemia: molecular classification and treatment options. *Br J Haematol*. mars 2008;140(6):610-24.
5. Matsuda K, Shimada A, Yoshida N, Ogawa A, Watanabe A, Yajima S, et al. Spontaneous improvement of hematologic abnormalities in patients having juvenile myelomonocytic leukemia with specific RAS mutations. *Blood*. 15 juin 2007;109(12):5477-80.
6. Imamura M, Imai C, Takachi T, Nemoto T, Tanaka A, Uchiyama M. Juvenile myelomonocytic leukemia with less aggressive clinical course and KRAS mutation. *Pediatr Blood Cancer*. oct 2008;51(4):569.
7. Alsultan A, Khalifah M, Alrabiaah AA. Spontaneous remission of juvenile myelomonocytic leukemia with NRAS mutation. *Pediatr Hematol Oncol*. oct 2012;29(7):624-6.
8. Doisaki S, Muramatsu H, Shimada A, Takahashi Y, Mori-Ezaki M, Sato M, et al. Somatic mosaicism for oncogenic NRAS mutations in juvenile myelomonocytic leukemia. *Blood*. 16 août 2012;120(7):1485-8.
9. Takagi M, Piao J, Lin L, Kawaguchi H, Imai C, Ogawa A, et al. Autoimmunity and persistent RAS-mutated clones long after the spontaneous regression of JMML. *Leukemia*. sept 2013;27(9):1926-8.
10. Flotho C, Kratz CP, Bergsträsser E, Hasle H, Starý J, Trebo M, et al. Genotype-phenotype correlation in cases of juvenile myelomonocytic leukemia with clonal RAS mutations. *Blood*. 15 janv 2008;111(2):966-7; author reply 967-8.

11. Ortiz MV, Skoda-Smith S, Rauen KA, Allan RW, Slayton WB. Juvenile myelomonocytic leukemia in a 16-year-old with Noonan syndrome: case report. *J Pediatr Hematol Oncol.* oct 2012;34(7):569-72.
12. Oliveira JB, Bidère N, Niemela JE, Zheng L, Sakai K, Nix CP, et al. NRAS mutation causes a human autoimmune lymphoproliferative syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 22 mai 2007;104(21):8953-8.
13. Niemela JE, Lu L, Fleisher TA, Davis J, Caminha I, Natter M, et al. Somatic KRAS mutations associated with a human nonmalignant syndrome of autoimmunity and abnormal leukocyte homeostasis. *Blood.* 10 mars 2011;117(10):2883-6.
14. Takagi M, Shinoda K, Piao J, Mitsuiki N, Takagi M, Matsuda K, et al. Autoimmune lymphoproliferative syndrome-like disease with somatic KRAS mutation. *Blood.* 10 mars 2011;117(10):2887-90.
15. Lanzarotti N, Bruneau J, Trinquand A, Stolzenberg M-C, Neven B, Fregeac J, et al. RAS-associated lymphoproliferative disease evolves into severe juvenile myelomonocytic leukemia. *Blood.* 20 mars 2014;123(12):1960-3.
16. Lenardo MJ. The molecular regulation of lymphocyte apoptosis. *Semin Immunol.* févr 1997;9(1):1-5.
17. Snow AL, Pandiyan P, Zheng L, Krummey SM, Lenardo MJ. The power and the promise of restimulation-induced cell death in human immune diseases. *Immunol Rev.* juill 2010;236:68-82.
18. Mateo V, Ménager M, de Saint-Basile G, Stolzenberg M-C, Roquelaure B, André N, et al. Perforin-dependent apoptosis functionally compensates Fas deficiency in activation-induced cell death of human T lymphocytes. *Blood.* 15 déc 2007;110(13):4285-92.
19. Brenner D, Krammer PH, Arnold R. Concepts of activated T cell death. *Crit Rev Oncol Hematol.* avr 2008;66(1):52-64.
20. Miles DK, Freedman MH, Stephens K, Pallavicini M, Sievers EL, Weaver M, et al. Patterns of hematopoietic lineage involvement in children with neurofibromatosis type 1 and malignant myeloid disorders. *Blood.* 1 déc 1996;88(11):4314-20.
21. Cooper LJ, Shannon KM, Loken MR, Weaver M, Stephens K, Sievers EL. Evidence that juvenile myelomonocytic leukemia can arise from a pluripotential stem cell. *Blood.* 15 sept 2000;96(6):2310-3.

22. Scrideli CA, Baruffi MR, Rogatto SR, Valera ET, Defavary R, Tone LG. B lineage acute lymphoblastic leukemia transformation in a child with juvenile myelomonocytic leukemia, type 1 neurofibromatosis and monosomy of chromosome 7. Possible implications in the leukemogenesis. *Leuk Res.* avr 2003;27(4):371-4.
23. Flotho C, Valcamonica S, Mach-Pascual S, Schmahl G, Corral L, Ritterbach J, et al. RAS mutations and clonality analysis in children with juvenile myelomonocytic leukemia (JMML). *Leukemia.* janv 1999;13(1):32-7.
24. Nakazawa T, Koike K, Agematsu K, Itoh S, Hagimoto R, Kitazawa Y, et al. Cytogenetic clonality analysis in monosomy 7 associated with juvenile myelomonocytic leukemia: clonality in B and NK cells, but not in T cells. *Leuk Res.* oct 1998;22(10):887-92.
25. Liu Z, Li H, Derouet M, Filmus J, LaCasse EC, Korneluk RG, et al. ras Oncogene triggers up-regulation of cIAP2 and XIAP in intestinal epithelial cells: epidermal growth factor receptor-dependent and -independent mechanisms of ras-induced transformation. *J Biol Chem.* 11 nov 2005;280(45):37383-92.
26. Schneiders UM, Schyschka L, Rudy A, Vollmar AM. BH3-only proteins Mcl-1 and Bim as well as endonuclease G are targeted in spongistatin 1-induced apoptosis in breast cancer cells. *Mol Cancer Ther.* oct 2009;8(10):2914-25.
27. Holler N, Zaru R, Micheau O, Thome M, Attinger A, Valitutti S, et al. Fas triggers an alternative, caspase-8-independent cell death pathway using the kinase RIP as effector molecule. *Nat Immunol.* déc 2000;1(6):489-95.
28. Vernitsky H, Rechavi O, Rainy N, Besser MJ, Nagar M, Schachter J, et al. Ras oncoproteins transfer from melanoma cells to T cells and modulate their effector functions. *J Immunol Baltim Md 1950.* 1 nov 2012;189(9):4361-70.
29. Chan RJ, Cooper T, Kratz CP, Weiss B, Loh ML. Juvenile myelomonocytic leukemia: a report from the 2nd International JMML Symposium. *Leuk Res.* mars 2009;33(3):355-62.
30. Magerus-Chatinet A, Stolzenberg M-C, Lanzarotti N, Neven B, Daussy C, Picard C, et al. Autoimmune lymphoproliferative syndrome caused by a homozygous null FAS ligand (FASLG) mutation. *J Allergy Clin Immunol.* févr 2013;131(2):486-90.

Phenotype	Genetics	Sex	Onset Mo	HMG cm	SMG cm	ADP	PSG	WBC 10 ⁹ /l N: 4-10	Mono 10 ⁹ /l N<1	Plts 10 ⁹ /l N: 150-450	HbF %	Blasts % BM	DN N<2,5	AI	Treatments	Age LFU
P1	KRAS															
RALD	p.G13C	M	60	3	5	Yes	Yes	3,3	0,8	76	0,8	2	6	AIHA	6-MP	Dcd
JMML	c.37G>T							38,9	8	132				ITP	Colchicine	20YO
															Rituximab	VP16
P2	NRAS															
LS JMML	p.G12A	F	30	4	6	Yes	Yes	13,4	1,9	302	1,1	1	2,5	No	None	Alive
	c.35G>C															15YO
P3	NRAS															
LS JMML	p.G12S	F	3	6	7	No	Yes	12,8	3,4	423	3,7	6	4,6	No	6-MP 4-43Mo	Alive
	c.34G>A															7YO
P4	KRAS															
JMML	p.G13D	M	3	6	7	No	Yes	12,4	2,5	48	11,7	5	1	No	6-MP	Alive
	c.38G>A														Vincri. VP16	40Mo
															Dexa. Aracy.	
															HSCT 9Mo	
P5	NRAS															
JMML	p.G12D	M	15	0	6	No	Yes	23,7	5	240	ND	18	2	No	HSCT 28Mo	Alive
	c.35G>A															4YO
	DelX13															
	NRAS															
P6	p.G12D	F	54	Yes	SplX	Yes	Yes	51,4	8,8	197	62,4	15	1	No	HSCT 56Mo	Dcd 6YO
JMML	c.35G>A															Relapse
	DelX7															

Table 1 : Principal clinical and biological characteristics of the patients.

RALD : RAS-associated Autoimmune Lymphoproliferative Disorder, JMML : Juvenile Myelomonocytic Leukaemia, Del X : Deletion of chromosome, M : Male, F : Female, YO : Years Old, Mo : Months, ADP : Lymphadenopathies, AI : Autoimmunity, AIHA : Auto-immune haemolytic anemia, ITP : Immune thrombocytopenia, HMG : Hepatomegaly, SMG : Splenomegaly, PSG : Bone marrow myeloid progenitors Spontaneous Growth and hypersensitivity to GM-CSF, HbF : Foetal Haemoglobin, BM : Bone marrow, N : Normal range, DN : Double negative TCRab+ cells, HSCT : Hematopoietic Stem Cell Transplantation, WBC: White Blood Cells, Mono : Monocytes, Plts : Platelets, LFU : Last Follow Up, Dcd : Deceased, 6-MP : 6-Mercaptopurine, VP-16 : Etoposide, Vincri. : Vincristine, Dexa. : Dexamethasone, Aracy.: Aracytine, Dcd : Deceased, SplX : Splenectomised, ND : No Data. Bold values are abnormal.

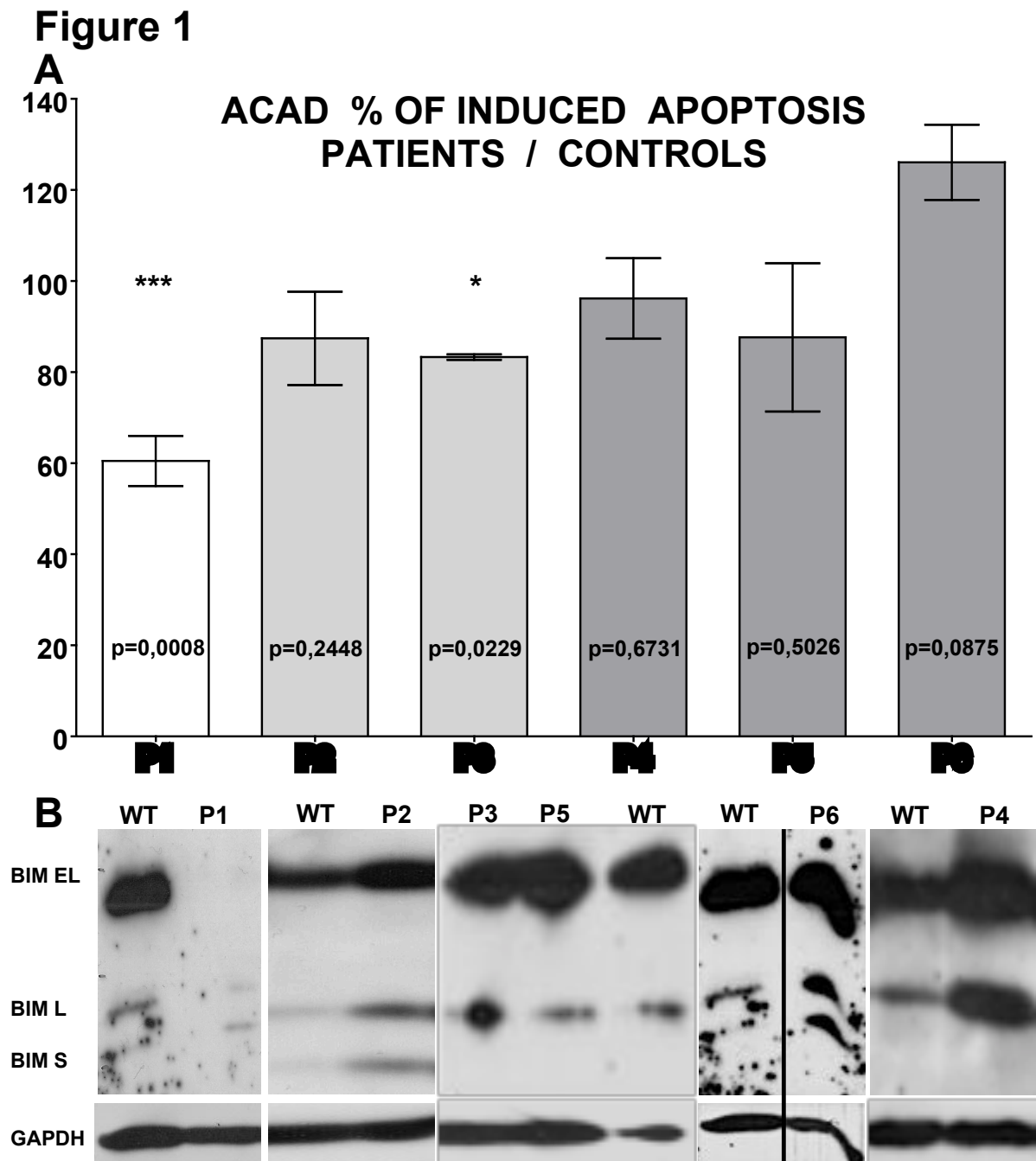
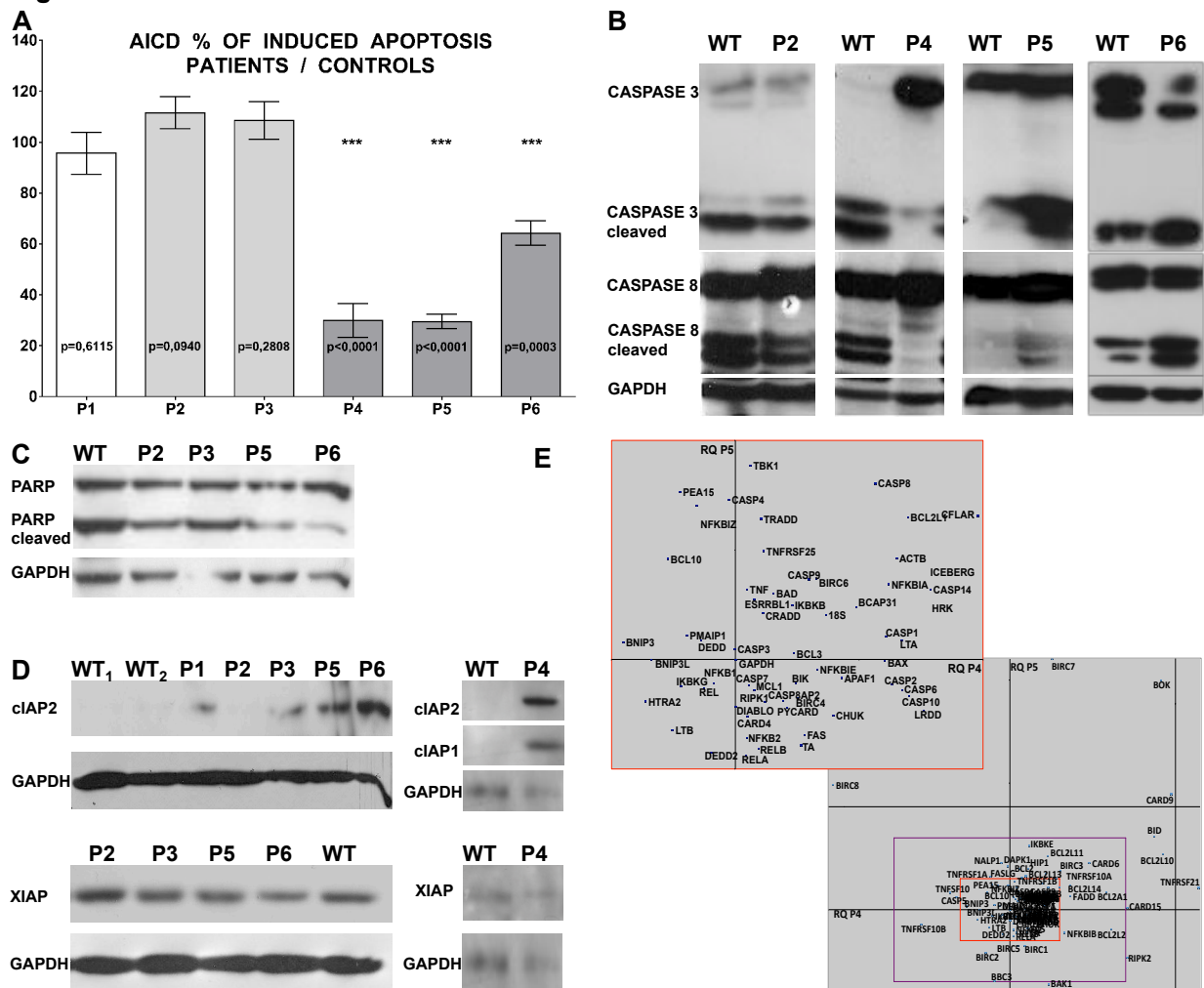


Figure 1: ACAD defect due to BIM down-regulation is specific to RALD

A: The ACAD of the 5 patients was tested in at least 3 independent experiments in duplicates and compared to P1. Values are compared to the controls for each experiment

B: BIM expression was assessed in the 6 patients' SEE activated T cells by western blot.

Figure 2**Figure 2: AICD defect due to caspase malfunction is specific to severe JMML**

A: The AICD of the 6 patients was tested in at least 3 independent experiments in duplicates. Values are compared to the controls for each experiment

B: The caspases expression and cleavage was assessed by western blot for 4 patients in AICD triggered SEE activated T-cells.

C: The cleaved caspase 3 efficiency was tested by assessing PARP cleavage by western blot in AICD triggered cultured SEE activated T-cells.

D: The expression of the IAPs was assessed by western blot for all patients in AICD triggered cultured SEE activated T cells.

E: The messenger RNA profiling of P4 and P5's activated T cells after TCR re stimulation (AICD challenge) was performed with taqman microfluidic cards and compared to two matched controls. Red square : RQ between 0,5 and 2, violet square : RQ between 0,2 and 5, axes intersect at 1, black lines at RQ = 10.

Figure 3

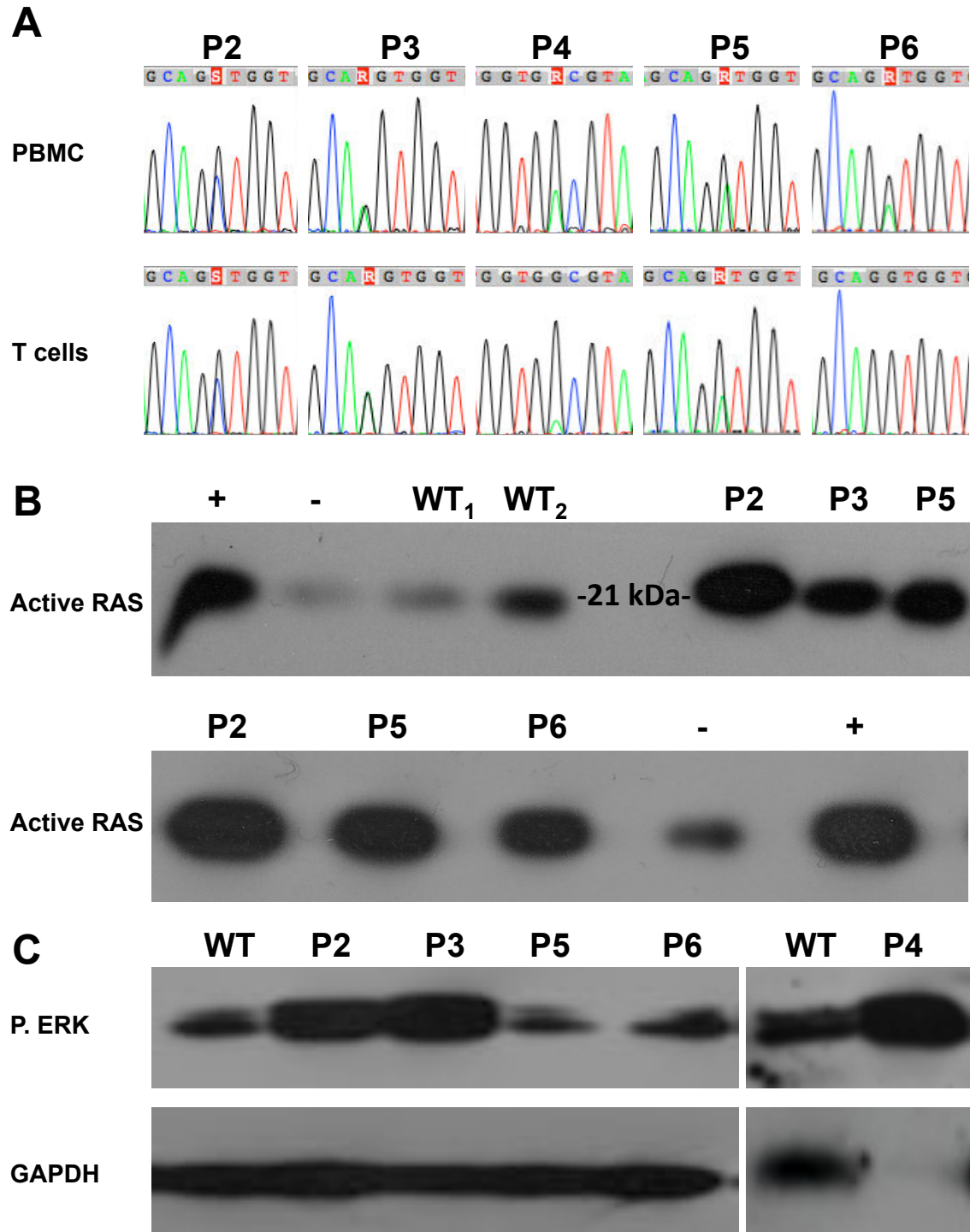
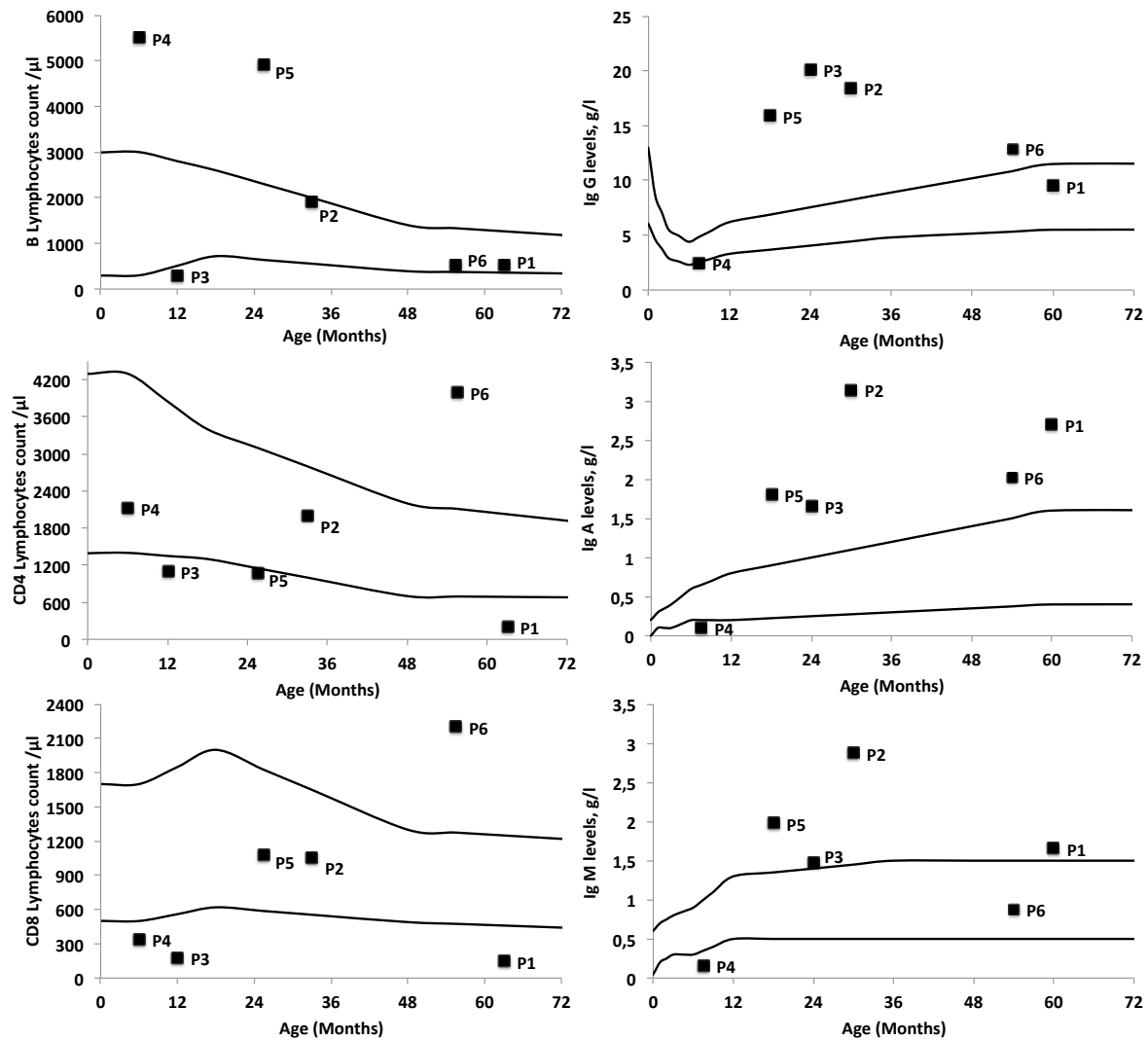


Figure 3: Apoptosis status of JMML patients is independent from RAS mutation, activation and ERK phosphorylation

A: The presence of the somatic RAS mutation was controlled by direct sequencing in PBMCs and cultured activated T cells for each patient.

B: The amount of active RAS in cultured activated T-cells was assessed using RAS pull down and detection assay.

C: The phosphorylation of ERK in cultured activated T-cells was assessed by western blot.

Figure S1**Figure S1:Details of the lymphoid compartment at diagnosis for the 6 patients.**

The absolute lymphocyte counts at diagnosis and immunoglobulin levels are represented for each patient, with normal higher and lower values as continuous lines. Ig: Immunoglobulins

Figure S2

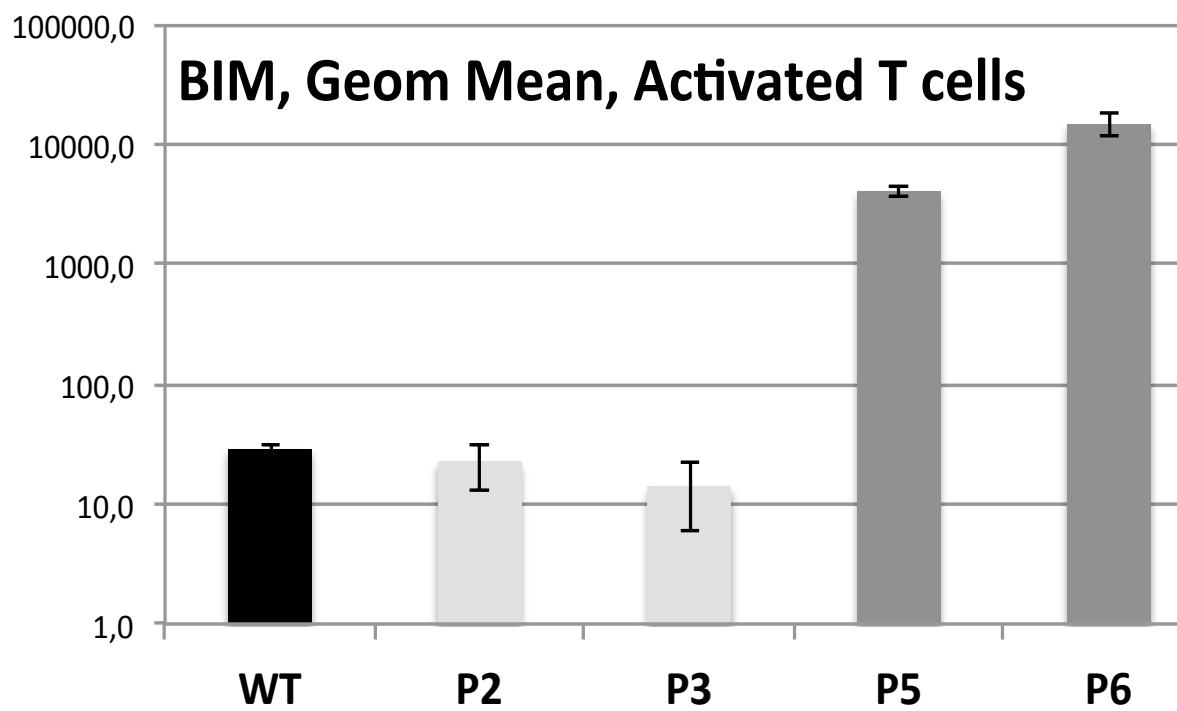
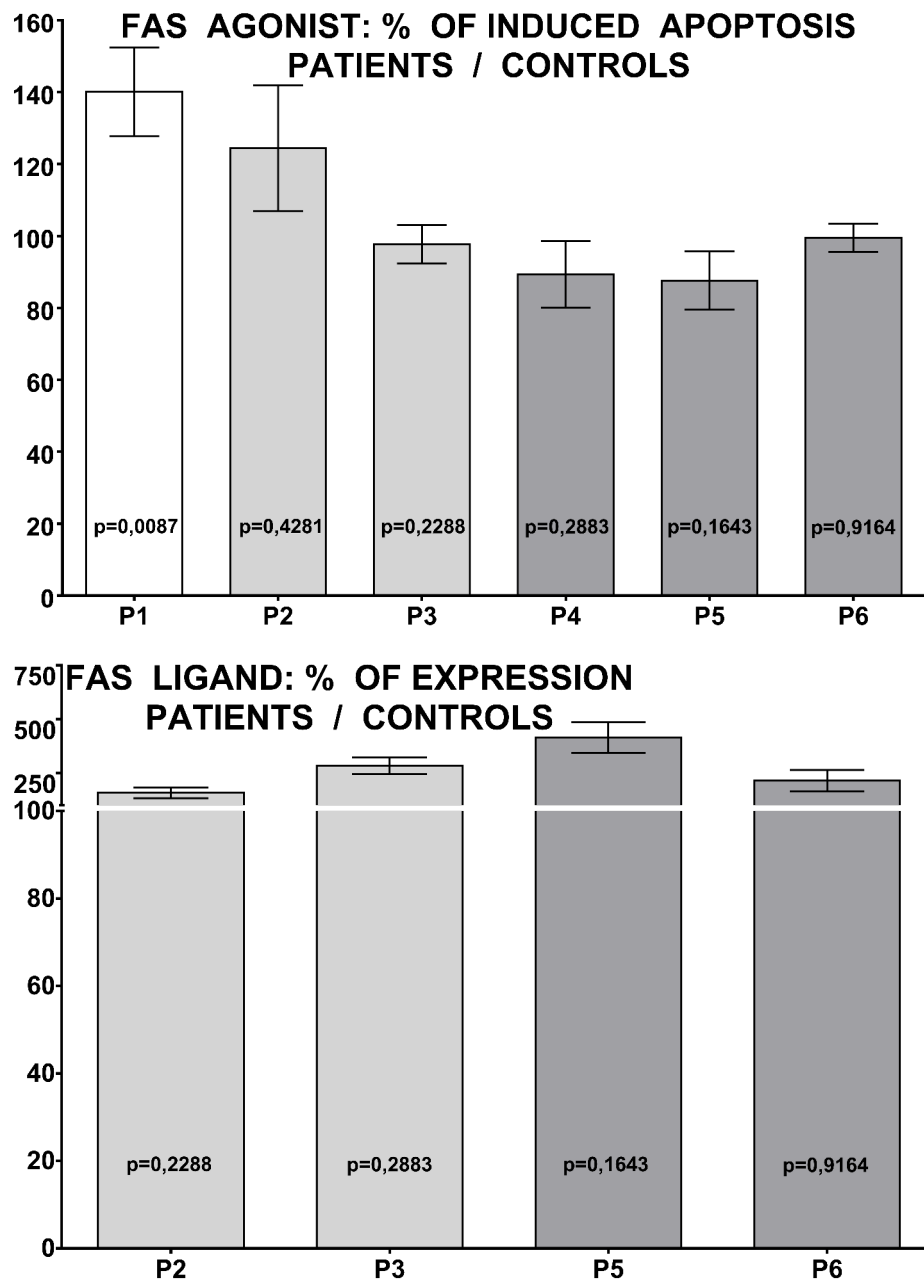


Figure S2: BIM expression on activated T-cells by Flow cytometry

The cultured SEE activated T cells from the patients were stained after permeabilisation with BIM-PE antibody, values are normalised with isotype control.

Figure S3

**Figure S3: AICD defect is not linked to decreased extrinsic apoptosis pathway**

A: The FAS-induced apoptosis of the 6 patients' SEE activated cultured T-cells was tested using agonist Apo1.3 100ng/ml antibody in at least 3 independent experiments in duplicates. Values are compared to the controls for each experiment.

B: Expression of intracellular Fas-ligand was assessed by flow cytometry and compared to controls in AICD triggered cultured SEE activated cultured T-cells.

C. Résultats supplémentaires

1. Concernant le RALD, P1

a) Le défaut d'ACAD et la diminution de BIM sont indépendants de la mutation de KRAS

Nous avons décrit le phénotype clinique et lymphocytaire du patient P1 atteint de RALD dans le premier article. La conclusion de cette description nous menait à l'hypothèse que la mutation de *RAS* à elle seule ne pouvait expliquer l'évolution du patient. De plus, dans l'article 2 nous avons rapporté que la diminution de BIM était absente de cellules pourtant mutées. Ainsi, nous avons fait l'hypothèse que la diminution de BIM était liée à un autre facteur. Nous avons alors poursuivi notre étude sur les fibroblastes issus d'une biopsie cutanée de P1, qui n'étaient pas porteurs de la mutation de *KRAS* c.37G>T. Comme le montre la figure 22, de façon surprenante, l'expression de BIM est réduite pour P1 en comparaison aux fibroblastes contrôles. Il a été démontré que l'induction d'un stress du réticulum endoplasmique par la thapsigargine entraîne une déphosphorylation de BIM par l'intermédiaire de l'activation de la phosphatase PP2A. Cette déphosphorylation inhibe la dégradation de BIM par le protéasome et induit une augmentation de son expression²⁸⁵. L'expérience décrite ci dessous révèle que contrairement aux fibroblastes contrôles, les fibroblastes de P1 n'ont pas d'augmentation de l'expression de BIM suite à l'exposition à la thapsigargine. De plus, nous montrons également que les fibroblastes de P1 ont une phosphorylation de ERK excessive par rapport aux contrôles, qui semble répondre de façon minime à la déphosphorylation induite par la thapsigargine.

Ainsi, nous observons le même profil biochimique pour les lymphocytes activés porteurs de la mutation de *KRAS* et pour les fibroblastes primaires non porteurs de cette mutation. Cette observation démontre que la mutation de *KRAS* n'explique pas à elle seule la diminution de BIM et la phosphorylation excessive de ERK. Il y a donc un autre événement présent au niveau des fibroblastes et des lymphocytes, probablement dans la lignée germinale, qui est responsable de ces anomalies.

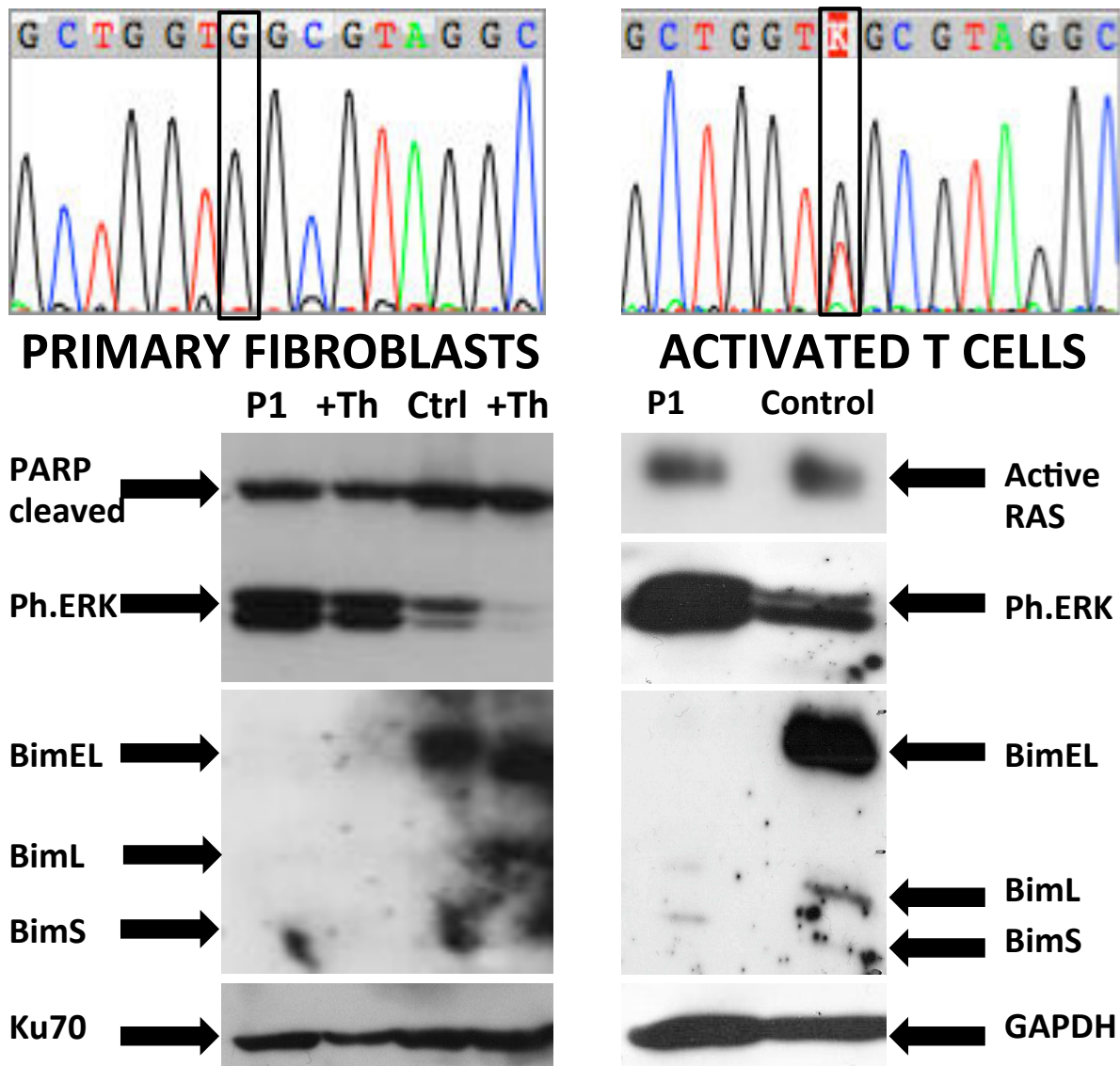


Figure 22 : Comparaison des phénotypes biochimiques des fibroblastes et lymphocytes T activés de P1. Le séquençage direct montre que la mutation hétérozygote c.37G>T est absente des fibroblastes. Le western blott a été réalisé sur des fibroblastes ayant ou non été exposés pendant 24heures à 1 μ M de thapsigargine (Th) et sur des lymphocytes T activés à la SEE et cultivés pendant 9 jours. Un RAS pull down a été réalisé sur ces mêmes lymphocytes. Ctrl : Contrôle.

Afin de poursuivre dans cette direction et de trouver l'événement responsable de la phosphorylation anormale de ERK et de la diminution de BIM dans les fibroblastes de P1, nous avons poursuivi les explorations biochimiques et étudié l'expression des autres protéines en amont de la voie des MAPK. La figure 23 montre le début de ces explorations et révèle qu'il y a en plus de la phosphorylation anormale de ERK une phosphorylation augmentée de PKC θ pour P1.

Ce premier résultat nous encourage à poursuivre les explorations dans cette voie, en cherchant par exemple des mutations sur les gènes codant pour les protéines jouant

un rôle dans cette signalisation, c'est pourquoi nous avons étudié l'exome (séquençage de l'ensemble des exons codants) de ce patient. Pour l'analyse des résultats, notre hypothèse principale était donc celle d'une mutation sur la voie des MAPK.

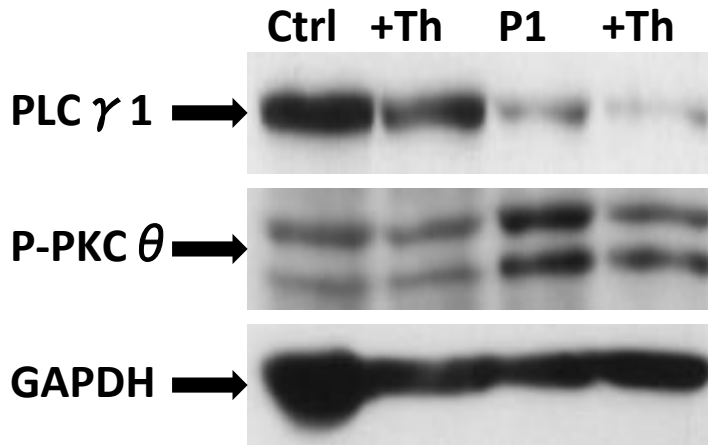


Figure 23 : Western blott sur fibroblastes contrôles et de P1. Ctrl : contrôle, Th : thapsigargine.

b) Identification de mutations germinales sur la voie RAS/MAPK

Lors de l'analyse du séquençage d'exome de P1, le meilleur gène candidat retenu est *SRC*, un proto-oncogène de la famille des non-récepteurs tyrosine kinases Src, dont font partie également FYN et LCK. Son activation fait suite à la stimulation de récepteurs de facteurs de croissances, d'intégrines, mais également à la stimulation du TCR²⁸⁶. La surexpression ou l'hyperactivation de SRC favorisent le développement de cancers²⁸⁷. En effet, l'activation de nombreuses voies peut découler de celle de SRC, dont la voie RAS-MEK-ERK et la voie PI3K-AKT.

Le domaine kinase de SRC contient un site d'autophosphorylation (Tyr419) nécessaire à l'activation complète de la protéine. Les domaines SH2 et SH3 sont impliqués dans la régulation négative de SRC. Lorsque la tyrosine terminale 530 est phosphorylée, la protéine adopte une conformation fermée et est inactive. Ainsi, la régulation de l'activité de SRC dépend du statut de phosphorylation de ses sites clefs, ainsi que de son ubiquitination (figure 25).



Figure 24 : Représentation schématique de la structure de la protéine SRC et de ses domaines, d'après Frame et Al.²⁸⁸

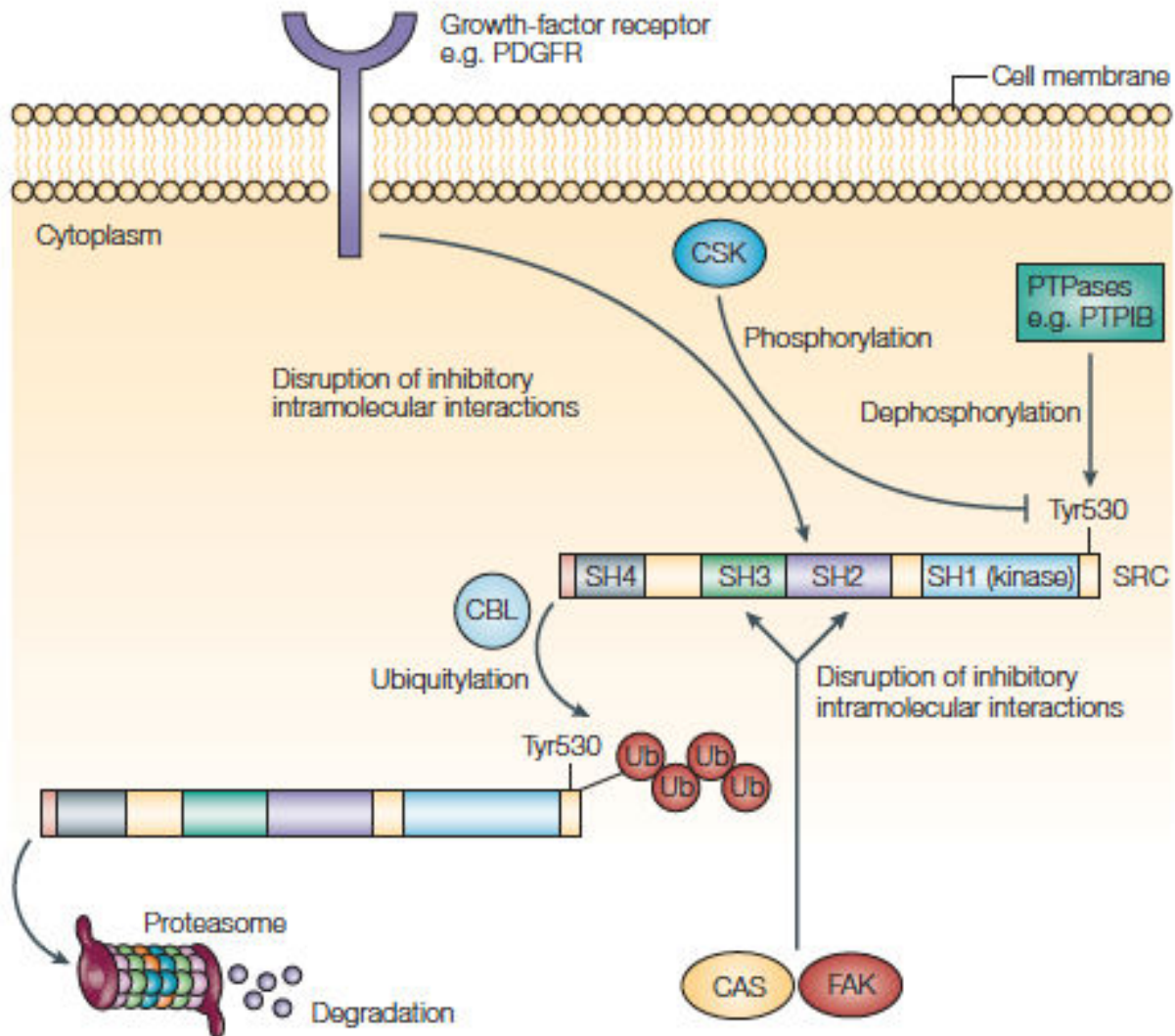


Figure 25 : Représentation schématique de la régulation de SRC, d'après Yeatman.²⁸⁹

La mutation trouvée par le séquençage d'exome se situe sur le domaine kinase de *SRC*. Il s'agit de la mutation non décrite c.974T>G, p.L325R, à l'état hétérozygote. Les algorithmes de prédiction des conséquences pathogènes ou non de mutations Polyphen et Sift lui attribuent les scores maximaux. La mutation est trouvée sur les fibroblastes et les lymphocytes T du patient (Figure 26).

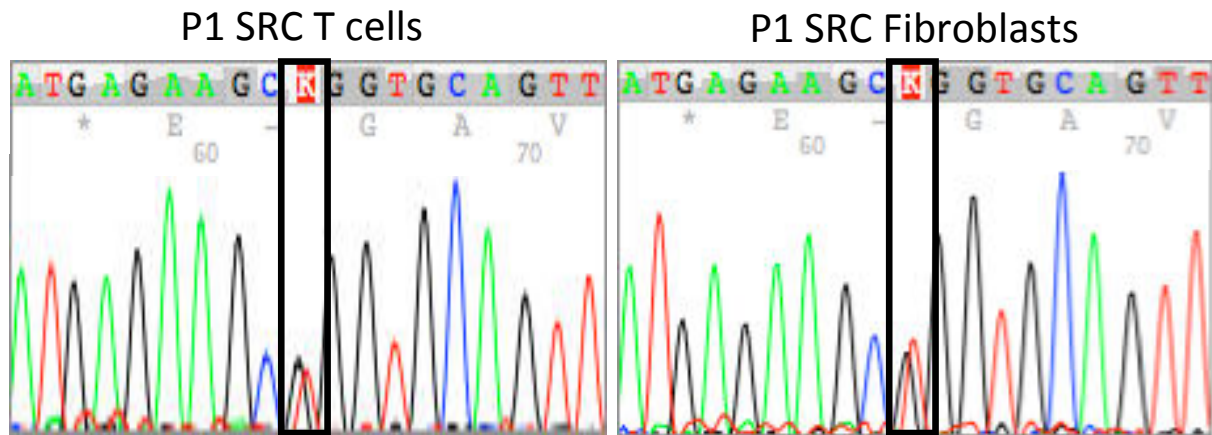


Figure 26 : Séquençage de SRC centré sur la mutation c.974T>G pour P1.

Une activation anormale de SRC découlant de cette mutation est notre hypothèse principale à l'heure actuelle. Les données de la littérature nous encouragent à poursuivre ces explorations étant donné que pour que l'activité oncogénique de SRC soit maximale, la coopération d'une hyperactivation de RAS semble nécessaire²⁹⁰. De plus, une diminution de BIM en rapport avec une hyperactivation de SRC entraînant une phosphorylation de ERK a été rapportée et ce à plusieurs reprises²⁹¹⁻²⁹⁴.

En plus de la poursuite du projet autour de SRC nous avons retenu 13 autres gènes candidats lors de l'analyse du séquençage de l'exome de P1 dont le *TGFBR2* sur la même voie de signalisation et dont la mutation pourrait entraîner un gain de fonction. Le tableau 7 récapitule les variations retrouvées à l'exome ayant un score élevé de probabilité d'impact sur la fonction de la protéine concernée ; et pour lesquelles l'analyse de la littérature rapporte une implication possible dans l'apoptose, les cancers, la voie des MAPK.

Nom complet	AA	cDNA	Polyp.	Sift	Arguments en faveur
Ankyrin repeat and MYND domain containing 1	T328M	c.983C>T	0,996	-	Pas de données mais pour d'autres gènes avec une mutation dans le domaine ankyrin repeat une hyperactivation de la voie MAPK ²⁹⁵ est rapportée
Rho GTPase activating protein 33	R823W	c.2467C>T	0,978	0,03	Possible substrat de Fyn ²⁹⁶
CUB and Sushi multiple domains 3	P1081T	c.3241C>A	0,958	-	Trouvé muté dans des cancers et autres syndromes ²⁹⁷
Dipeptidyl-peptidase 9	R281C	c.841C>T	0,975	-	Impliqué dans l'activation et l'apoptose des lymphocytes ²⁹⁸ Aussi impliqué dans les leucémies ²⁹⁹
Diphosphoinositol pentakisphosphate kinase 1	Q1395Stop	c.4183C>T	-	-	Kinase intervenant dans beaucoup de voies de signalisation (incluant l'apoptose) ³⁰⁰
Reversion-inducing-cysteine-rich protein with kazal motifs	R509Q	c.1526G>A	0,998	-	Expression changée dans différents cancers ³⁰¹
RPGRIP1-like	R967C	c.2899C>T	0,938	-	Impliqué dans les centrosomes et les cils. Possible suppresseur de tumeur ³⁰²
Solute carrier family 22, member 18	L235P	c.704T>C	0,978	-	Gène référencé comme suppresseur de tumeur ³⁰³
Solute carrier organic anion transporter family, member 6A1	C549Y	c.1646G>A	1	-	Transporteur d'anions gonade-spécifique. Egalement un antigène tumoral ³⁰⁴
Thromboxane A synthase 1 (platelet)	S124G	c.370A>G	0,986	0,02	Monooxygénase impliquée dans l'aggrégation des plaquettes. Expression dans certains cancers.
Transforming growth factor, beta receptor II (70/80kDa)	S578T	c.1732T>A	0,969	-	Récepteur de facteur de croissance impliqué dans la prolifération cellulaire et dans le développement des tumeurs ³⁰⁵
Zinc finger protein, FOG family member 2	H798D	c.2392C>G	0,973	0,04	Régule les gènes GATA. Aussi impliqué dans les tumeurs de la lignée germinale ³⁰⁶
Zinc finger protein 277	D95V	c.284A>T	0,968	0,01	Régulateur du développement et de la différenciation. Peu de données

Tableau 7 : Gènes candidats et leurs mutations retenus en seconde intention après analyse de l'exome de P1.

2. Concernant les S-JMML, P4, P5, P6

a) *Le défaut d'activation ou de l'activité des caspases n'influence pas l'ACAD*

Nous avons décrit dans le deuxième article trois patients atteints de formes sévères de JMML et dont les lymphocytes T activés montraient un défaut d'AICD. Ce défaut d'AICD était indépendant de la mutation de *RAS* et secondaire à des défauts des caspases, en lien avec une expression anormale des IAPs. Cependant, malgré ce défaut des caspases, l'ACAD était normale. Nous avons donc testé l'hypothèse selon laquelle cette dernière était indépendante des caspases.

Pour tester cette hypothèse, nous avons employé un inhibiteur des caspases irréversible à large spectre, le ZVAD. La figure 27 illustre son efficacité sur un contrôle lorsque la voie FAS est déclenchée par un anticorps agoniste (Apo1.3). Elle montre aussi que lors de l'ACAD, l'ajout de ZVAD n'inhibe pas la mort cellulaire. Ainsi, pour ce contrôle et dans nos conditions expérimentales, l'ACAD peut être indépendante des caspases.

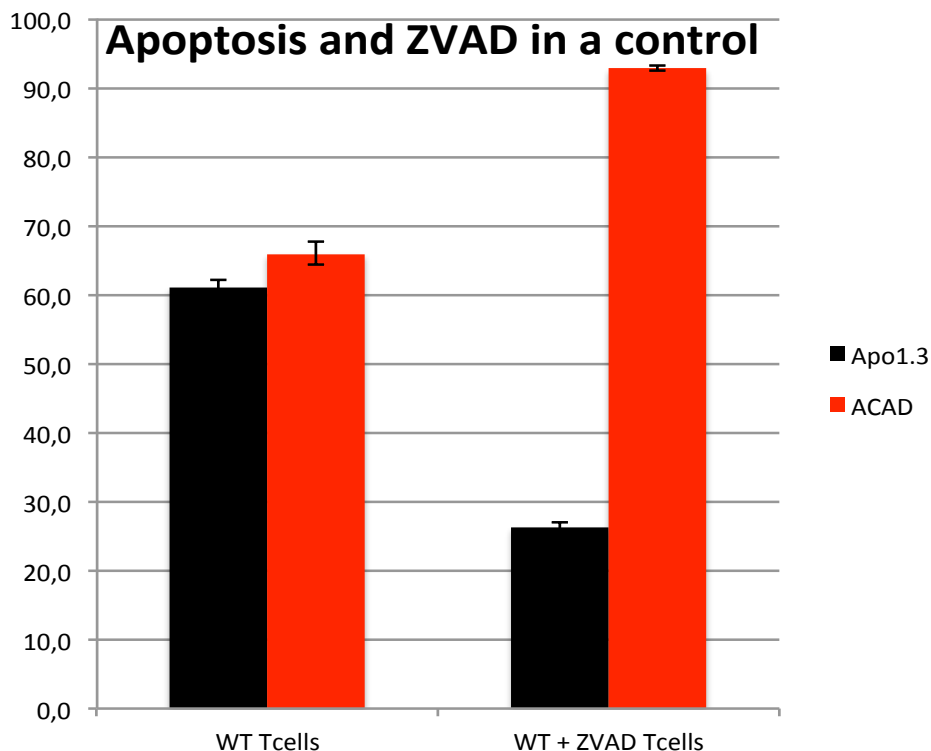


Figure 27 : Apoptose induite par FAS et ACAD avec ou sans ZVAD chez un contrôle.

Dans l'expérience suivante, l'ACAD a été testée pour les patients P3, P5 et P6, en présence ou en absence de ZVAD (figure 28). Celle-ci reste inchangée. Ainsi, si nous n'observons pas de défaut d'ACAD chez ces patients qui ont un défaut d'activité des caspases, c'est probablement parce que celle-ci peut être indépendante des caspases. Une ACAD indépendante des caspases et initiée par BIM a déjà été mise en évidence dans des modèles de cancers du sein et du colon^{307,308} (et du poumon mais via BAK³⁰⁹).

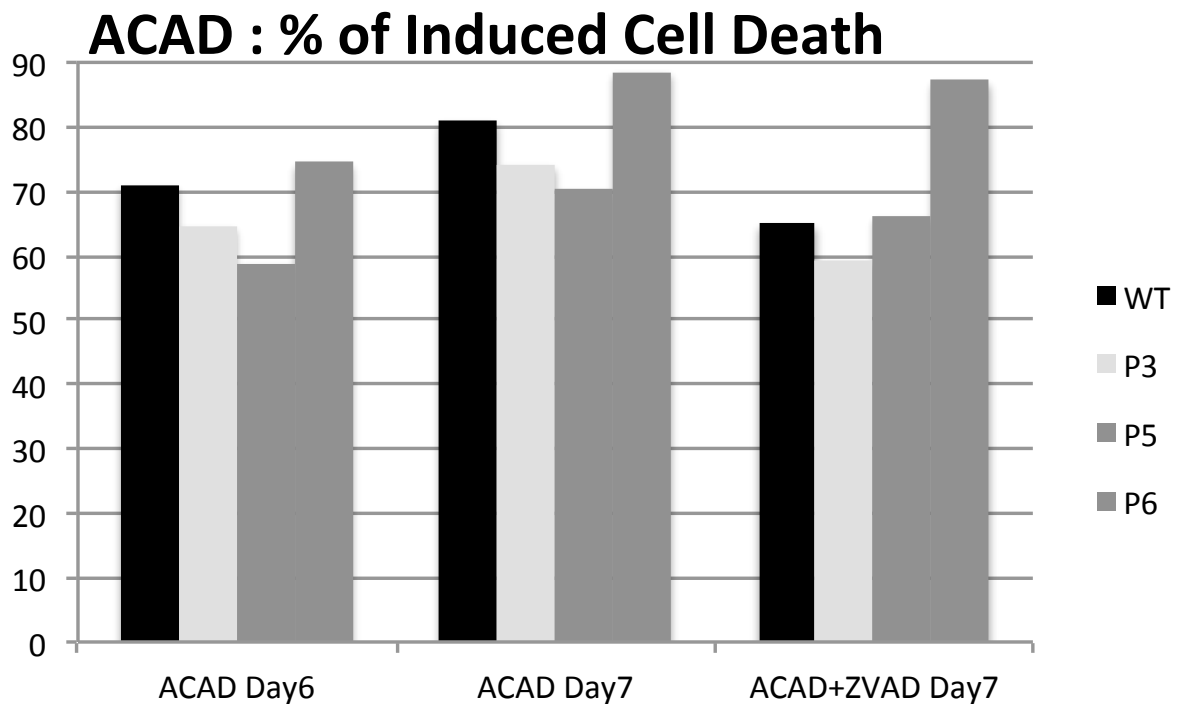


Figure 28 : ACAD sans ou en présence de ZVAD

b) Facteurs s'ajoutant à RAS

Afin d'identifier les facteurs additionnels aux mutations de *RAS* induisant le phénotype sévère et les défauts de la voie de l'AICD observés chez les trois patients atteints de S-JMML, nous avons étudié plusieurs pistes, en partant toujours des lymphocytes T activés sur lesquels les expériences d'apoptose avaient été réalisées. Nous avons ainsi étudié la transcription des gènes de l'apoptose (Cf Article 2), la méthylation du génome, l'expression des micro-ARNs et recherché des mutations additionnelles.

(1) Pas d'anomalies majeures de la méthylation

La méthode LUMA, pour Luminometric methylation assay a été utilisée afin de rechercher des différences globales de méthylation de l'ADN entre les patients S-JMML, LS-JMML et RALD. Cette méthode est basée sur l'évaluation de la méthylation des îlots CpG dans les séquences CCGG. L'ADN est digéré dans deux réactions séparées par les enzymes de restriction HpaII et MspI. HpaII est sensible à la méthylation alors que MspI ne l'est pas. Les deux enzymes laissent une extrémité 5'-CG après coupure. Un ratio est ensuite calculé : HpaII/MspI ; plus l'ADN est globalement dé-méthylé, plus ce ratio s'approche de 1, moins il l'est, plus ce ratio s'approche de 0. Afin de normaliser les digestions enzymatiques, EcoRI, qui laisse des extrémités 5'-AATT après coupure, est incluse dans les deux réactions de digestion. Après digestion, l'ajout séquentiel de nucléotides (ATP, puis GTP+CTP, puis TTP, puis GTP+CTP) qui vont s'apparier à l'extrémité simple brin coupée permet de déterminer la quantité d'extrémités 5'-CG et 5'-AATT laissées. En effet, l'appariement des nucléotides entraîne la conversion de pyrophosphate inorganique en ATP par l'ATP-sulfurylase et l'adénosine-5'-phosphosulfate. L'ATP formé est alors utilisé par la luciférase pour convertir la luciférine en oxyluciférine ce qui entraîne une production proportionnelle de lumière qui est détectée par une caméra³¹⁰.

L'utilisation de la méthode LUMA a permis de révéler qu'il n'y a pas de différences significatives de la méthylation globale des îlots CpG entre sujets sains, patients atteints de RALD, LS-JMML et S-JMML (Tableau 8). Les détails de l'expérience sont fournis en annexe.

	Hpa/Msp	% méthylation
	(Hpa/Eco)/(Msp/Eco)	
Contrôle	0,25	75,32
P1	0,25	75,39
P2	0,27	73,17
P4	0,29	71,17
P5	0,22	77,95
P6	0,27	73,39

Tableau 8 : Résultats de l'étude de la méthylation en LUMA

(2) Profil d'expression des MicroARN

Nous nous sommes intéressés en parallèle à l'expression des micro-ARNs dans les lymphocytes activés des patients étudiés. Les micro-ARNs sont de courtes séquences d'ARN simple brin non codant dont l'appariement avec une séquence complémentaire d'un ARN messager peut conduire à la régulation négative de ce dernier. Nous avons utilisé des cartes micro-fluidiques commerciales permettant le séquençage de l'ensemble des micro-ARN répertoriés par PCR quantitative. Afin de mettre en évidence des variations associées au défaut d'AICD, nous avons comparé les profils de deux patients LS-JMML (AICD normale) et deux patients S-JMML (AICD déficiente).

Nous avons ainsi retenu les micro-ARNs pour lesquels des variations (une expression différentielle d'un facteur au moins égal à 2) sont présentes chez les patients S-JMML mais pas chez les deux LS-JMML. Le tableau 9 fait figurer les différences entre les deux groupes de patients.

(a) Variations communes à P4 et P5

Les variations communes aux deux patients S-JMML sont celles du micro-ARN 345 dont l'expression est modérément augmentée (entre 2 et 5 fois par rapport aux LS-JMML) et du micro-ARN 656 dont l'expression est fortement diminuée (plus d'un log de différence).

Ces résultats très préliminaires concordent avec les données de la littérature, qui cependant ne sont pas abondantes étant donné que ce champ de recherche est très récent. Cependant, il a déjà été publié que le micro-ARN 345 serait impliqué dans la réponse immunitaire³¹¹ et son expression augmentée dans les cancers prostatiques et coliques à haut risque^{312,313}. Une cible bien identifiée de ce micro-ARN est BAG3³¹⁴, une chaperonne au rôle anti-apoptotique³¹⁵. Par ailleurs, le micro-ARN 656, lui, serait diminué dans les cancers³¹⁶, l'une de ses cibles étant un membre de la famille du TGF β ³¹⁷.

(b) Expressions augmentées

Concernant P5, le seul autre micro-ARN dont l'expression est augmentée, bien que modérément, entre 2 et 5 fois par rapport aux LS-JMML, est le micro-ARN 31. Cette variation nous semble cependant intéressante, car ce micro-ARN peut avoir un rôle oncogénique par l'activation de la voie RAS dans les cancers³¹⁸.

Les micro-ARN 494 et 126 sont augmentés chez P4 avec une expression relative supérieure à 5 fois celle des LS-JMML. Or, le micro-ARN 494 a été identifié comme ayant pour cibles des gènes pro et anti apoptotiques³¹⁹. Il aurait un effet protecteur vis à vis de l'apoptose dans certains modèles via l'activation de AKT³²⁰ et serait augmenté dans les rétinoblastomes³²¹. Quand au micro-ARN 126, son expression serait augmentée dans les leucémies aiguës myéloïdes, et son atténuation éliminerait les clones progéniteurs leucémiques³²². En effet, ce micro-ARN régulerait la signalisation d'AKT³²³.

(c) Expressions diminuées

Que ce soit pour P4 ou pour P5, il y a plus de micro-ARNs dont l'expression est diminuée par rapport aux LS-JMML que de micro-ARNs dont l'expression est augmentée. Si l'on considère les diminutions d'expression supérieures à 5 fois la valeur observée chez les LS-JMML, pour P5 il ne reste que le micro-ARN 656 (évoqué précédemment).

Pour P4, plus de 10 micro-ARN sont concernés. Si l'on considère ceux dont l'expression change d'un facteur au moins égal à 10, on retrouve le micro-ARN 581 dont l'expression est quasi éteinte. Celui-ci serait diminué dans les carcinomes hépatocellulaires³²⁴ mais nous ne disposons pas de données supplémentaires sur ses cibles. Une diminution de l'expression du micro-ARN 93 semblable à celle retrouvée chez P4 a été rapportée comme associée à un mauvais pronostic dans les cancers coliques³²⁵. Ce micro-ARN serait un régulateur de la phosphorylation d'AKT³²⁶. Une diminution du micro-ARN 30a-5p a également été rapportée dans les cancers, en association avec une absence de régulation négative de PIK3CD, faisant de ce micro-ARN un suppresseur de tumeurs³²⁷.

	RQ P2	RQ P3	RQ P4	RQ P5		RQ P2	RQ P3	RQ P4	RQ P5
hsa-miR-581	1	0,694	0,000	0,365	hsa-miR-656	1	0,522	0,000	0,090
hsa-miR-656	1	0,522	0,000	0,090	hsa-miR-627	1	1,768	1,410	0,210
hsa-miR-93#	1	1,082	0,017	1,058	hsa-miR-302c	1	0,507	0,711	0,231
hsa-miR-30a-5p	1	1,390	0,066	1,088	hsa-miR-494	1	1,306	6,022	0,291
hsa-miR-652	1	1,059	0,093	0,338	hsa-let-7a	1	1,721	0,358	0,305
hsa-miR-301b	1	0,906	0,110	1,365	hsa-miR-652	1	1,059	0,093	0,338
hsa-miR-30e-3p	1	1,552	0,112	1,022	hsa-miR-581	1	0,694	0,000	0,365
hsa-let-7b	1	1,774	0,116	0,601	hsa-miR-98	1	1,950	0,963	0,394
hsa-miR-29a	1	0,762	0,182	1,160	RNU44	1	1,166	0,467	0,420
hsa-miR-15b	1	1,635	0,183	1,473	hsa-miR-200c	1	0,619	0,377	0,423
hsa-miR-598	1	1,003	0,187	1,077	hsa-miR-886-3p	1	1,100	1,533	0,432
hsa-miR-24	1	1,055	0,193	0,934	hsa-miR-125a-5p	1	0,800	0,289	0,439
hsa-miR-130b	1	1,488	0,197	0,921	hsa-miR-214	1	0,965	0,748	0,444
hsa-let-7g	1	1,871	0,215	1,056	hsa-miR-628-5p	1	0,647	2,478	0,499
hsa-miR-19a	1	1,832	0,239	0,679	hsa-miR-363	1	1,251	0,457	0,535
hsa-miR-766	1	0,983	0,245	1,091	hsa-miR-324-3p	1	1,866	0,633	0,542
hsa-miR-339-3p	1	1,586	0,249	1,308	hsa-miR-320	1	1,746	0,742	0,584
hsa-miR-125a-5p	1	0,800	0,289	0,439	hsa-let-7b	1	1,774	0,116	0,601
hsa-miR-590-3P	1	1,186	0,349	1,326	hsa-miR-19a	1	1,832	0,239	0,679
hsa-let-7a	1	1,721	0,358	0,305	hsa-miR-483-5p	1	0,799	1,080	0,695
hsa-miR-200c	1	0,619	0,377	0,423	hsa-miR-422a	1	1,283	0,652	0,746
hsa-miR-17	1	1,116	0,381	0,853	hsa-let-7d	1	1,047	0,509	0,807
hsa-miR-20b	1	1,566	0,390	1,112	hsa-miR-17	1	1,116	0,381	0,853
hsa-miR-363	1	1,251	0,457	0,535	hsa-miR-103	1	1,944	0,677	0,856
RNU44	1	1,166	0,467	0,420	hsa-miR-126	1	0,900	5,783	0,893
hsa-miR-21	1	1,621	0,474	1,151	hsa-miR-130b	1	1,488	0,197	0,921
hsa-let-7d	1	1,047	0,509	0,807	hsa-miR-24	1	1,055	0,193	0,934
hsa-miR-213	1	0,504	0,522	1,264	hsa-miR-223#	1	0,736	1,739	0,986
hsa-miR-29c	1	1,946	0,542	1,258	hsa-miR-331	1	1,715	0,782	1,008
RNU48	1	1,350	0,565	1,568	hsa-miR-92a	1	1,653	0,854	1,020
hsa-miR-505#	1	0,764	0,605	1,305	hsa-miR-30e-3p	1	1,552	0,112	1,022
hsa-miR-425-5p	1	0,886	0,608	1,081	hsa-let-7g	1	1,871	0,215	1,056
hsa-miR-324-3p	1	1,866	0,633	0,542	hsa-miR-93#	1	1,082	0,017	1,058
hsa-miR-422a	1	1,283	0,652	0,746	hsa-miR-598	1	1,003	0,187	1,077
hsa-miR-103	1	1,944	0,677	0,856	hsa-miR-425-5p	1	0,886	0,608	1,081
hsa-miR-302c	1	0,507	0,711	0,231	hsa-miR-30a-5p	1	1,390	0,066	1,088
hsa-miR-320	1	1,746	0,742	0,584	hsa-miR-766	1	0,983	0,245	1,091
hsa-miR-106a	1	1,730	0,745	1,337	hsa-miR-20b	1	1,566	0,390	1,112
hsa-miR-214	1	0,965	0,748	0,444	hsa-miR-21	1	1,621	0,474	1,151
hsa-miR-629	1	1,119	0,777	1,229	hsa-miR-29a	1	0,762	0,182	1,160
hsa-miR-331	1	1,715	0,782	1,008	hsa-miR-25	1	1,848	1,178	1,227
hsa-miR-92a	1	1,653	0,854	1,020	hsa-miR-629	1	1,119	0,777	1,229
hsa-miR-146a	1	1,963	0,935	1,230	hsa-miR-146a	1	1,963	0,935	1,230
hsa-miR-98	1	1,950	0,963	0,394	hsa-miR-29c	1	1,946	0,542	1,258
hsa-miR-484	1	1,836	1,078	1,415	hsa-miR-213	1	0,504	0,522	1,264
hsa-miR-483-5p	1	0,799	1,080	0,695	hsa-miR-505#	1	0,764	0,605	1,305
hsa-miR-25	1	1,848	1,178	1,227	hsa-miR-339-3p	1	1,586	0,249	1,308
hsa-miR-627	1	1,768	1,410	0,210	hsa-miR-590-3P	1	1,186	0,349	1,326
hsa-miR-886-3p	1	1,100	1,533	0,432	hsa-miR-106a	1	1,730	0,745	1,337
hsa-miR-223#	1	0,736	1,739	0,986	hsa-miR-301b	1	0,906	0,110	1,365
hsa-miR-31	1	1,119	1,747	3,145	hsa-miR-484	1	1,836	1,078	1,415
hsa-miR-221	1	1,883	1,894	1,507	hsa-miR-15b	1	1,635	0,183	1,473
hsa-miR-628-5p	1	0,647	2,478	0,499	hsa-miR-221	1	1,883	1,894	1,507
hsa-miR-345	1	1,769	3,600	4,323	RNU48	1	1,350	0,565	1,568
hsa-miR-126	1	0,900	5,783	0,893	hsa-miR-31	1	1,119	1,747	3,145
hsa-miR-494	1	1,306	6,022	0,291	hsa-miR-345	1	1,769	3,600	4,323

Tableau 9 : Profils d'expression des microARN des patients atteints de JMML

(3) Séquençage de l'exome

Toujours à la recherche des facteurs responsables de la gravité de la JMML et du profil fonctionnel et biochimique observé, nous avons réalisé une analyse de l'exome des lymphocytes T activés. Les résultats de l'analyse à savoir les variants pertinents, c'est à dire dont la conséquence pourrait avoir une influence sur l'apoptose et expliquer un défaut d'AICD, sont présentés ci-dessous.

(a) P4

(i) SIVA1

Lors de l'analyse du séquençage d'exome des lymphocytes T activés de P4, la recherche de mutations de gènes en lien avec l'apoptose a retrouvé deux candidats, le meilleur étant *SIVA1*. La protéine SIVA1 est exprimée dans les lymphocytes B et T activés et les thymocytes. Elle interagit avec BCL-XL par son domaine amphipathique hélicoïdal situé dans sa partie N-terminale. Les complexes ainsi formés entraînent une diminution de l'expression de BCL-XL, favorisant ainsi l'apoptose mitochondriale^{328,329}. La protéine SIVA a de plus une fonction inhibitrice de NF- κ B par l'intermédiaire de son interaction avec TRAF2 lors de la stimulation du TCR, participant ainsi à la sensibilisation des lymphocytes T à l'AICD³³⁰. L'expression de *SIVA1* est régulée par les facteurs de transcription *P53* et *E2F1* qui se lient au niveau de son promoteur pour en induire la transcription³³¹.

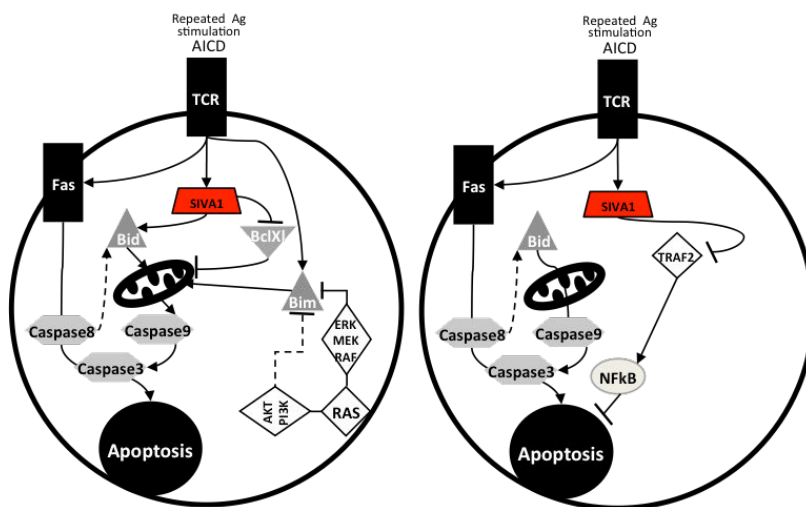
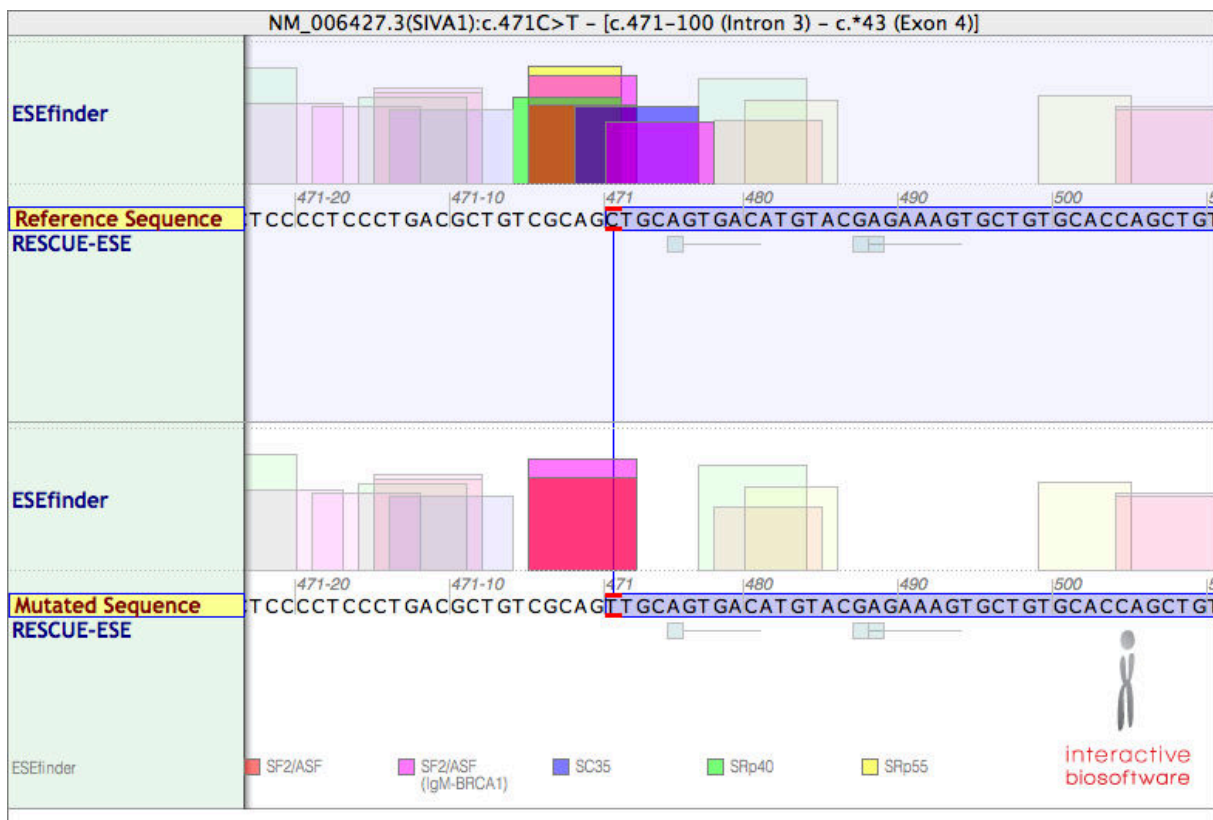
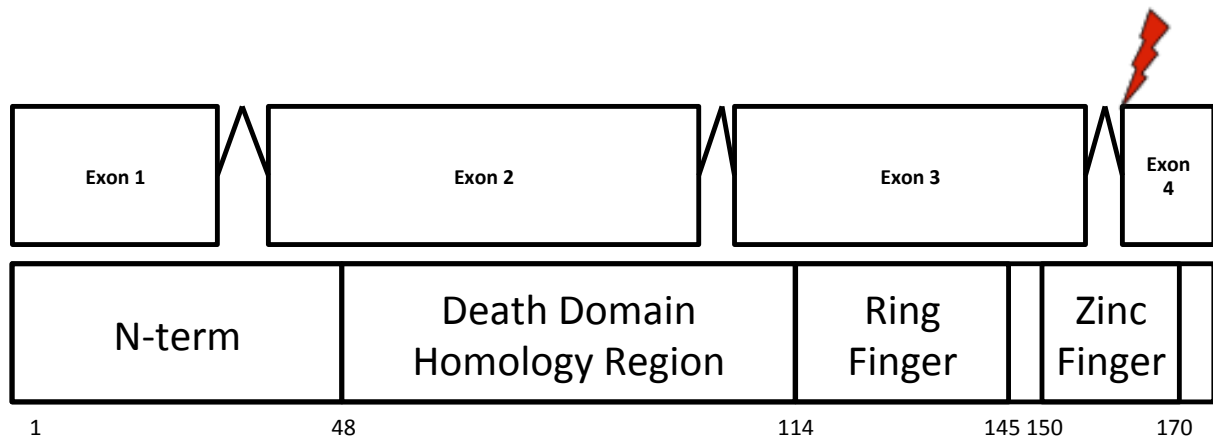


Figure 29 : Représentation schématique de l'implication de SIVA1 dans l'AICD.

La mutation retrouvée au cours de l'étude par l'exome est une mutation hétérozygote silencieuse c.471C>T, p.D157D, mais se situe au niveau du 1er nucléotide de l'exon 4 codant pour la région Zinc Finger (Figure 30), pouvant être à l'origine d'une suppression de sites d'épissage (Figure 31).



Etant donné que les données de la littérature sus-citées concordaient avec nos expérimentations, bien que la mutation soit silencieuse, nous avons poursuivi nos investigations. En effet, il y avait pour P4 un défaut d'AICD malgré une apoptose induite par FAS normale de façon tout à fait similaire à ce qui avait été décrit sur des Jurkat SIVA1 knock out, et BCL-XL semblait manquer d'une régulation négative (Figure 32),

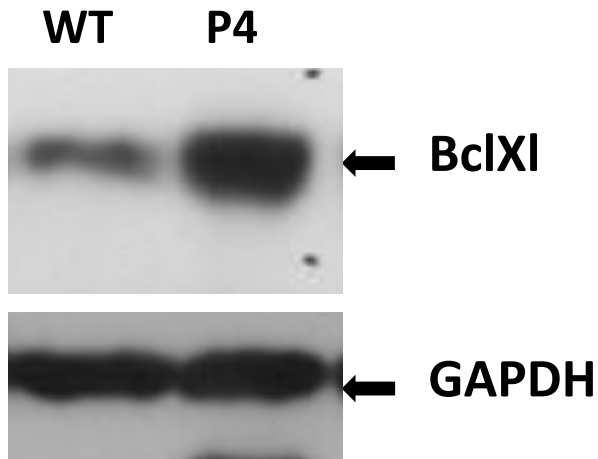


Figure 32 : BCL-XL est surexprimé chez P4.

Notre première hypothèse a été celle d'un défaut complet de transcritpion. Cependant, une PCR sur le cDNA des lymphocytes T activés (Figure 33) a montré que le transcrit de SIVA1 était bien exprimé dans les lymphocytes T présentant le défaut d'AICD. Notre deuxième hypothèse a donc été celle d'une diminution relative de l'expression de ce transcrit dans ces cellules, ce qui semblait possible au vu de la diminution du pic de la mutation sur le cDNA par rapport à l'ADN (Figure 34).

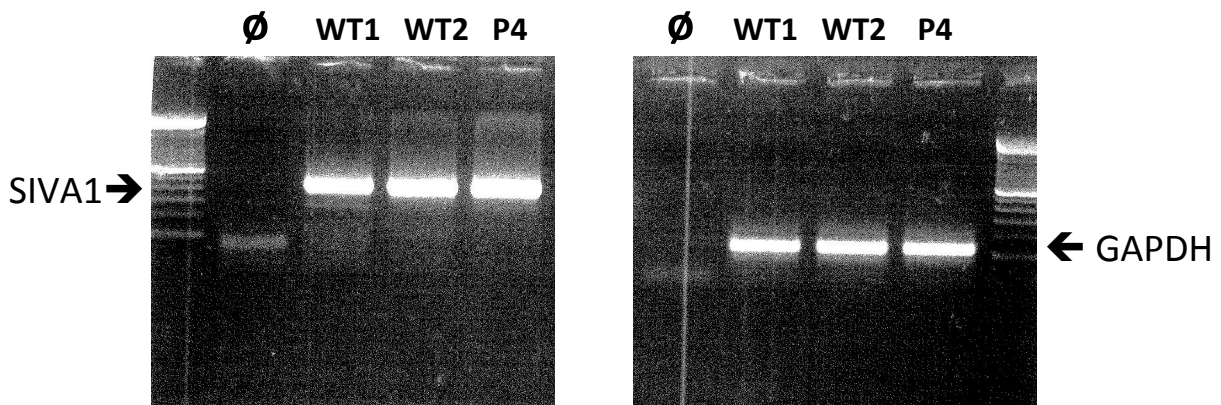


Figure 33 : Le transcrit SIVA1 est exprimé dans les lymphocytes T activés de P4

Cependant nous n'avons pas mis en évidence de diminution du transcrit de *SIVA1* pour P4 par qPCR (Figure 35) et avons donc éliminé ce gène de notre liste de candidats.

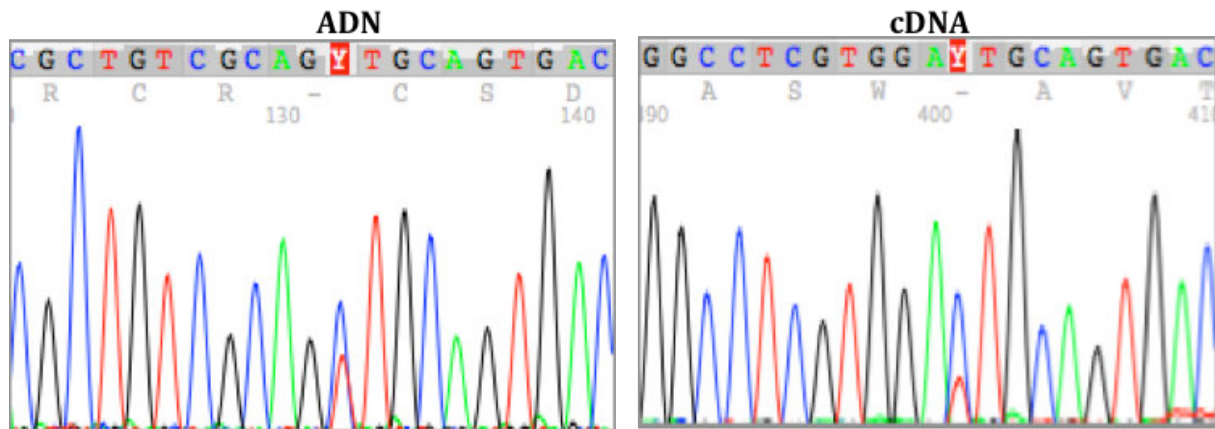


Figure 34 : Séquençage de *SIVA1* sur l'ADN de lymphocytes T4

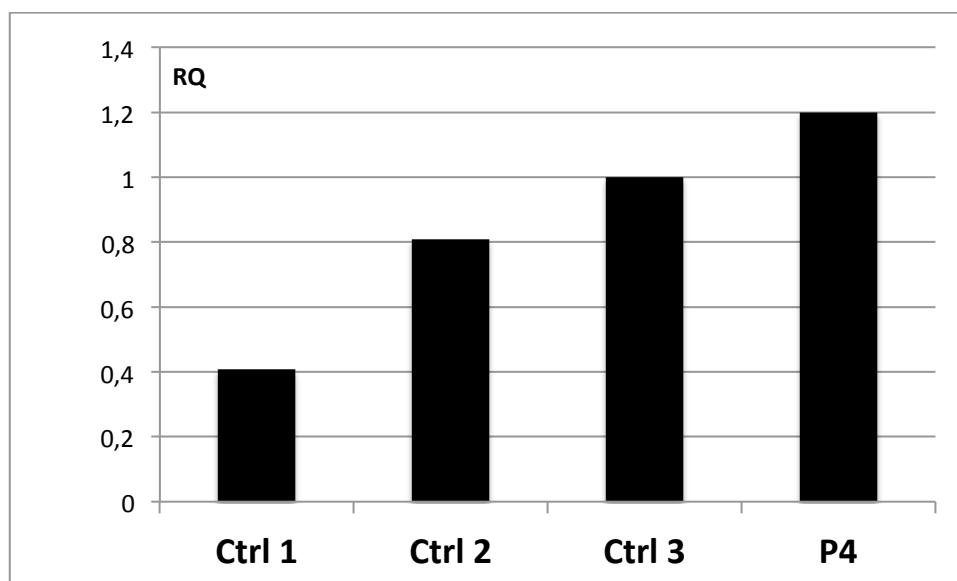


Figure 35 : PCR quantitative sur *SIVA1* pour P4 et ses contrôles

(ii) *IL12RB1*

Parmi les autres variations retrouvées dans l'exome, une seule se trouve sur un gène pour lequel un rôle dans l'apoptose et la voie RAS/MAPK a été précédemment rapporté ; il s'agit du récepteur Béta 1 de l'IL12 (*IL12RB1*). Cette chaîne du récepteur est commune à l'IL23, et il a été décrit sur les lignées 293T (cellules embryonnaires rénales

humaines) et HeLa (cancer du col utérin humain) qu'une augmentation de l'expression de l'IL12RB1 induit l'activation des CASPASES 9 et 3, une apoptose des cellules et une inhibition de la voie RAS/MAPK³³². Une perte de fonction de cette chaîne pourrait donc avoir des effets anti-apoptotiques. De plus, des variations de l'*IL12RB1* ont été rapportées comme associées de façon statistiquement significative aux lymphomes de l'enfant³³³.

Cette mutation hétérozygote non décrite, p.P449S, c.1345C>T, est prédite comme probablement dommageable par Polyphen, qui prend en considération les propriétés physiques de la protéine, mais pas par l'algorithme Sift, qui ne prend en considération que le degré de conservation des acides aminés entre les espèces. Elle se situe sur l'exon 12, dans la portion extracellulaire du récepteur, proche du domaine transmembranaire (exon 14). Il s'agit d'un domaine de type Fibronectine III, impliqué dans les interactions protéine-protéine et l'adhésion cellulaire.

Il s'agit donc du gène candidat qui sera étudié dans la suite de ce projet, dans l'hypothèse d'une perte de fonction. D'autres mutations ont été rapportées par l'analyse de l'exome pour P4, mais pour lesquelles les données de la littérature ne fournissent pas de lien fort avec l'apoptose ou les cancers et leucémies. Un tableau récapitulatif de ces dernières est présenté en annexe.

(b) P5

L'analyse de l'exome des lymphocytes activés de P5 révèle trois gènes candidats dont le rôle dans l'apoptose et/ou les cancers et/ou la voie des MAPK est documenté (Tableau 10).

Etant donné le rôle de l'intégrine bêta 2 dans l'apoptose des polynucléaires neutrophiles, la variation de ce gène semble être la première à explorer, compte tenu de sa pertinence avec la JMML.

Gène	AA	cDNA	Poly.	Sift	Arguments
Integrin, beta 2 (complement component 3 receptor 3 and 4 subunit)	R285C	c.853C>T	0,884	-	Joue un rôle dans l'apoptose des polynucléaires neutrophiles ^{334,335} et interviendrait via ERK ³³⁶
Serine/threonine kinase 33	I295V	c.883A>G	0,284	0,04	Sa suppression dans des cellules transformées par KRAS induit leur apoptose ^{337,338}
Transforming growth factor, beta receptor associated protein 1	M231T	c.692T>C	0,971	0,01	Intervient dans la signalisation du TGFB et par conséquent peut activer les MAPK ³³⁹

Tableau 10 : Variations retrouvées lors de l'analyse de l'exome pour P5

(c) P6

L'analyse de l'exome des lymphocytes activés de P6 a révélé des variations hétérozygotes non décrites dans plusieurs gènes pouvant jouer un rôle dans l'apoptose, la voie RAS/MAPK, le développement de cancers et leucémies. Ceux-ci, non encore explorés, figurent dans le tableau 11.

Le premier candidat à explorer serait DLC1, étant donné d'une part les forts scores de prédiction de retentissement sur la fonction de la protéine et d'autre part les données de la littérature disponibles. En effet DLC1 est impliqué dans la voie RAS (GAP) et dans l'apoptose. Une surexpression de DLC1 dans la lignée A431 (carcinome épithélial humain) entraîne une augmentation de l'expression de BAX, une diminution de celle de BCL-2 et une activité accrue de CASPASE 3^{340,341}. De plus, les mutations de DLC1 que l'on retrouve dans les cancers se situent au niveau du domaine FAT, muté pour P6 également.

Description	AA	cDNA	Polyp.	Sift	Arguments en faveur
Cathepsin B	K237- No frameshift	c.709_711 delAAG	0	0	Initie l'apoptose caspase indépendante de lignées cancéreuses (poumon, foie, neurones) ³⁴² , est un mécanisme d'apoptose utilisé pour la tolérance aux hautes doses d'Ag ^{343,344}
Deleted in liver cancer 1 (DLC1)	D239Y Domaine FAT, muté dans les cancers	c.715G>T	0,999	-	Rho GAP ³⁴⁵ dont l'expression est fréquemment diminuée dans de nombreux cancers ³⁴⁶ , suppresseur de tumeurs dans les lymphomes B et autres cancers, par apoptose ³⁴⁷⁻³⁴⁹
Trio Rho GNEF	V2148M	c.6442G>A	-	-	Régule l'adhésion et la migration cellulaire via RAC1 ³⁵⁰
Ras and Rab interactor 3	A817T	c.2449G>A	0,422	0,03	GNEF pour RAB31, trafic vésiculaire ³⁵¹
Connector enhancer of kinase suppressor of Ras 1	T8N	c.23C>A	0,302	0,01	Chaperonne de la voie AKT/FOXO, action pro-prolifératrice et anti-apoptotique ³⁵²
Myeloid / lymphoid or mixed lineage leukemia, transloc. to 4	I1490M	c.4470C>G	0,999	0,01	Soumise à la phosphorylation de ERK, des mutations augmentent le risque de cancers ^{353,354}
Suppression of tumorigenicity 18 (breast carcinoma) (zinc finger protein)	T376M	c.1127C>T	0,995	-	Suppresseur de tumeurs ³⁵⁵ , active les caspases effectrices ³⁵⁶

Tableau 11 : Variants retrouvés lors de l'analyse de l'exome pour P6, ayant un rapport avec l'apoptose et / ou la voie RAS / MAPK et / ou les cancers.

DISCUSSION PERSPECTIVES

III. DISCUSSION - PERSPECTIVES

A. Concernant le cas de RALD

Ce travail a débuté par l'identification d'un patient atteint de RALD, issu de notre cohorte de malades présentant un syndrome de type ALPS mais pour lesquels aucune mutation de *FAS* n'avait pu être identifiée.

1. Les données de la littérature reproduites...

Nos expérimentations nous ont permis de confirmer les données publiées depuis la description récente de plusieurs cas de cette nouvelle entité. Ces données et les nôtres convergent vers l'attribution à l'hyperactivité de la voie RAS au sein des lymphocytes activés d'un défaut de contrôle apoptotique de la réponse immunitaire T lors du sevrage en cytokines, suite à la dégradation de BIM liée à sa phosphorylation par la voie des MAPK/ERK. Ce défaut d'ACAD serait, par analogie au défaut d'AICD dans l'ALPS, le substrat physiopathologique sous-jacent à l'apparition des symptômes à type de lympho-prolifération et auto-immunité.

2. ... Complétées...

Cependant, le patient dont nous avons décrit l'évolution nous enseigne que la même mutation oncogénique somatique de *RAS* peut entraîner l'apparition des trois phénotypes chez un même patient : le phénotype RALD, puis LS-JMML et enfin S-JMML. Ceci est conforté par la publication récente de cas de patients guéris de JMML présentant à distance des stigmates de lympho-prolifération et/ou d'auto-immunité de façon concomitante à la présence de clones mutés pour *RAS*, pouvant également avoir une diminution de l'expression de BIM. Notre première conclusion est donc que dans le cas des mutations oncogéniques somatiques de *RAS* au niveau des progéniteurs hématopoïétiques, il existe un continuum entre RALD – LS-JMML – S-JMML, et que des facteurs additionnels, génétiques, épigénétiques ou autres entrent en jeu et sont déterminants dans l'évolution clinique des patients.

3. ... Mises en perspective

Cette première conclusion a été confortée par les recherches additionnelles effectuées sur les fibroblastes de ce patient, qui nous ont montré de façon surprenante que bien que non porteurs de la mutation de *KRAS*, ceux-ci présentaient malgré tout une phosphorylation augmentée de ERK 1 et 2 et une diminution de BIM. Il est donc dorénavant indéniable que pour ce patient atteint de RALD au moins, il existe, probablement au niveau germinale puisque l'anomalie est observée au niveau des fibroblastes, un autre événement que la mutation de *RAS*, ayant lui aussi pour effet d'activer la voie des MAPK et entraînant une diminution de BIM.

Dans le but de conforter ces données, nous effectuons à l'heure actuelle des tests fonctionnels sur ces fibroblastes afin de confirmer un défaut d'apoptose lors du sevrage en facteurs de croissance, c'est à dire en sérum, qui serait l'équivalent du défaut d'ACAD observé sur les lymphocytes. La diminution du clivage de PARP lors de l'induction de la voie mitochondriale via BIM par la thapsigargine est un premier argument en faveur de l'existence de ce défaut fonctionnel. Immédiatement après nous essaierons de restaurer l'expression de BIM en utilisant des inhibiteurs directs de l'action de ERK 1 et 2 phosphorylées afin de confirmer le lien de causalité entre cette phosphorylation anormale observée et la diminution de BIM.

Nous avons par ailleurs réalisé une analyse de l'exome pour ce patient, et avons identifié deux mutations sur deux gènes codant pour la protéine SRC et le TGFBR2, ayant tous deux un rôle dans la voie RAS/MAPK. La poursuite de ce travail sera donc de faire la preuve expérimentale de l'implication fonctionnelle de ces mutations pour les fibroblastes de ce patient, par des tests fonctionnels d'apoptose, des restaurations de l'expression de BIM à l'aide d'inhibiteurs spécifiques de ERK phosphorylée, SRC et TGFBR2 ; et enfin des transfections. Notre hypothèse stipulant que le RALD de ce patient n'est pas lié uniquement à la mutation de *KRAS* mais également à d'autres mutations ayant une influence sur la voie des MAPK serait ainsi confirmée. De plus, la mutation de *RAS* étant somatique elle serait plutôt un deuxième événement que l'événement initiateur dans ce cas. Enfin, il restera à déterminer quels facteurs ont joué quels rôles dans l'évolution péjorative du patient.

B. Concernant les cas de JMML

En parallèle, nous avons comparé l'apoptose de lymphocytes activés de patients atteints de JMML, sévères ou non, mutés dans *NRAS* ou *KRAS*. Dans aucun de ces cas nous n'avons retrouvé le défaut d'ACAD pourtant décrit comme caractéristique de ces mutations.

1. Le défaut d'ACAD n'est pas systématique

D'après nos données, il semblerait que l'ACAD puisse être indépendante des caspases. Ces observations devront être confirmées sur plus de sujets contrôles.

De plus, il n'y a pas systématiquement de défaut d'ACAD, même lorsque 100% des cellules T portent la mutation de *RAS* et que l'on détecte bien un excès de protéine *RAS* active et de phosphorylation de *ERK*. Cependant, nous retrouvons bien une corrélation entre *BIM* et l'ACAD, puisque le seul cas où un défaut d'ACAD est observé est également le seul cas où *BIM* est diminuée. Ainsi, l'ACAD serait déclenchée par *BIM* mais de façon indépendante des caspases.

Par ailleurs, il nous reste à élucider le problème suivant : pourquoi la phosphorylation anormale de *ERK* n'entraîne pas systématiquement une diminution de *BIM*, comme chez P2, P3 et P4 ? Cette observation est en faveur de notre hypothèse selon laquelle pour P1 un événement additionnel sur la voie des *MAPK/ERK* est nécessaire à la diminution de *BIM* et à l'apparition d'un défaut d'ACAD.

2. Le défaut d'AICD

a) Est discriminant

Par ailleurs, bien que l'apoptose extrinsèque soit normale comme en témoigne le test fonctionnel utilisant un agoniste de *FAS*, l'Apo1.3, nous avons révélé un défaut d'AICD. Ce défaut apparaît uniquement dans le cas des patients présentant une forme sévère de JMML, alors que nos deux patientes ayant eu une rémission sous traitement de

leur JMML et non traitées depuis plusieurs années ont une apoptose strictement normale.

Ce défaut d'AICD n'est pas en lien avec une diminution de la protéine BIM, qui au contraire semble augmentée. Etant donné que le défaut d'AICD permet de séparer les phénotypes de JMML, on suppose ici encore la survenue d'événements additionnels qui non seulement confèrent un degré de malignité élevée aux cellules de la lignée myéloïde, mais qui de plus ont une influence sur la régulation de l'homéostasie lymphocytaire (comme en témoignent les chiffres anormalement élevés de lymphocytes circulants chez les trois patients S-JMML), par le biais d'un défaut d'AICD.

La suite du travail entrepris après confirmation de ces données chez un plus grand nombre de patients sera donc la caractérisation des événements additionnels et pour ce faire, différentes approches sont nécessaires, à commencer par les explorations du défaut fonctionnel sur un plan biochimique.

b) Est en rapport avec des anomalies des caspases

Le défaut d'AICD des patients atteints de S-JMML est corrélé à des anomalies au niveau de l'activation et / ou de la fonction des caspases, initiatrices comme effectrices, sans que des mutations de ces dernières n'aient été retrouvées. Ces anomalies des caspases semblent être en rapport avec un défaut de régulation des IAPs, dont l'expression n'était pas régulée négativement après l'adjonction du stimulus apoptotique, sans que des mutations des gènes codant pour leurs régulatrices SMAC ou HTRA2 n'aient été retrouvées.

Nous en avons donc conclu que le ou les événement(s) additionnel(s) à la mutation de *RAS* qui déterminent le pronostic des patients atteints de S-JMML dans notre cohorte agissent sur l'apoptose lymphocytaire dépendante des caspases, probablement par le biais de leurs protéines régulatrices dont l'expression n'est pas répressible.

Il sera crucial par la suite de compléter par western blott le profil d'expression de l'ensemble des protéines de l'apoptose pour les trois patients atteints de S-JMML.

c) Et une transcription (a)normale ?

Pour continuer, nous avons entrepris une approche par biologie moléculaire. Après avoir éliminé des mutations des gènes des caspases et de leurs protéines régulatrices, nous nous sommes intéressés à la transcription des gènes de l'apoptose. Nous avons vu (Article 2) que la grande majorité des gènes n'est pas anormalement transcrite au cours du processus d'AICD. En particulier, cIAP1 et 2, dont l'expression protéique aurait dû diminuer lors de l'AICD, n'étaient pas surexprimés au niveau de l'ARN messager, ce qui plaide en faveur de modifications post-traductionnelles de ces deux protéines. Ces modifications post-traductionnelles seraient ainsi à l'origine du défaut d'apoptose via une inhibition de l'activation et de l'activité des caspases.

Il y avait cependant certaines dérégulations d'expression des ARN messagers concernant d'autres gènes que ceux sus-cités. Pour P4, la plupart des gènes dérégulés interviennent dans la voie intrinsèque de l'apoptose comme illustré dans le tableau 12. Ces dérégulations en faveur de l'apoptose nous ont paru refléter une tentative de compensation du défaut d'apoptose des lymphocytes par un mécanisme restant à élucider, plus qu'une cause du défaut observé.

Patient	Gène	RQ	Implication
P4	DR6	13,71	Induit l'apoptose mitochondriale ³⁵⁷
P4	BIRC8	0,08	Inhibiteur spécifique de CASPASE 9 ³⁵⁸
P4/P5	BOK	8,12/171	Effectrice de la famille BCL2
P4/P5	BID	7,41/5,1	Inductrice de la famille BCL2
P4	RIPK2	5,08	Son domaine CARD active les caspases ³⁵⁹

Tableau 12 : Gènes favorisant l'apoptose par la voie mitochondriale dont l'expression est augmentée

Il y aurait pourtant peut être ici une piste à approfondir, étant donné que quelques activateurs de NF- κ B étaient également dérégulés, en faveur de son activation

(tableau 13) et que l'expression d'un gène anti-apoptotique de la voie mitochondriale BCL2L10³⁶⁰ était aussi augmentée (8,36 fois la valeur contrôle). Cependant, ces variations restent peu importantes, d'un facteur inférieur à 10 fois la valeur trouvée chez les contrôles.

Patient	Gène	RQ	Implication
P4	CARD9	9,4	Recrute BCL2L10 pour activer le NF-kB ³⁶¹
P4	CARD15	5,07	Active le NF-kB ³⁶²
P4	RIPK2	5,08	Active le NF-kB ³⁵⁹

Tableau 13 : Transcription en faveur de l'activation du NF-kB au cours de l'AICD de P4

Concernant P5, il y a comme pour P4 une augmentation de la transcription de BID et BOK, majeure pour BOK, qui cependant nous semble difficilement pouvoir être la cause d'un défaut d'AICD étant donné son rôle d'effecteur de l'apoptose.

Cependant, il existe des dérégulations d'expression en défaveur de l'apoptose, comme illustré dans le tableau 14, qui pourraient être une piste intéressante, en particulier BIRC7, dont le facteur d'expression est supérieur à 200 fois la valeur normale. Pour la suite, nous évaluerons l'expression protéique de BIRC7 par western blott et étudierons son site promoteur ainsi que les facteurs de transcription impliqués dans son expression.

Patient	Gène	RQ	Implication
P5	BAK	0,19	Effectrice de la famille BCL2
P5	CARD9	13,26	Recrute BCL2L10 pour activer le NF-kB ³⁶¹
P5	BIRC8	16,46	Inhibitrice de l'apoptose augmentée dans les syndromes myélodysplasiques ³⁶³
P5	BIRC7	272,84	Inhibitrice de l'apoptose dont l'expression est très augmentée dans de nombreux cancers ³⁶⁴

Tableau 14 : Transcription en défaveur de l'apoptose au cours de l'AICD de P5

d) N'est pas corrélé à l'hyperactivation de la voie RAS

En ce qui concerne le rôle de l'activation de la voie RAS dans le défaut d'AICD chez les patients S-JMML, nous avons constaté que la présence de la protéine RAS active en excès n'est pas corrélée à un pourcentage élevé de cellules mutées pour RAS.

Il n'y a pas non plus de corrélation entre la phosphorylation de ERK et l'expression de BIM. La protéine RAS est bien détectée sous sa forme active en grandes quantités pour les LS-JMML et il y a bien une phosphorylation augmentée de ERK, mais cela ne suffit pas à entraîner une diminution de BIM. Ceci est toujours en faveur de notre hypothèse de la nécessité d'un événement additionnel chez P1 expliquant la diminution de BIM. L'augmentation de BIM chez les S-JMML est indépendante de la mutation et de l'activité de RAS, et semble en rapport avec la diminution de l'AICD, en tant que mécanisme compensateur.

	Lymphocytes T RAS mutés	Active RAS pulldown sur Lymphocytes T	Phosphorylation de ERK 1 et 2	BIM
P1	100%	+	↗	↘
P2	100%	++++	↗	→
P3	100%	++	↗	→
P4	20%	ND	↗	↗
P5	20-50%	+++	→	↗
P6	<10%	++	→	↗

Tableau 15 : Récapitulatif de la corrélation entre mutation de RAS et activité de la voie RAS/MAPK/ERK

e) Les données du miRNome et de l'exome ouvrent les perspectives

Les anomalies de la cascade de l'apoptose que nous avons détectées en biochimie, c'est à dire les caspases non clivées ou clivées et non actives, et les IAPs trop exprimées, n'ont pas pu être expliquées directement par des mutations des gènes codant pour ces protéines ni par une transcription anormale de ces dernières. Nous pensons donc à des

événements additionnels dont les conséquences se répercuteraient sur la régulation post-traductionnelle des protéines de l'apoptose. L'analyse de l'expression des micro-ARN et de l'exome nous oriente et nous avons à présent plusieurs gènes et micro-ARN candidats. La suite de ce projet sera ainsi essentiellement orientée vers l'élucidation des événements additionnels intervenant dans le RALD et les S-JMML.

Pour P1, nous nous orientons vers une mutation sur la voie des MAPK, avec un gain de fonction de SRC et/ou de TGFBR2. Les fibroblastes de ce patient étant porteurs de cet événement additionnel, nous poursuivrons les expériences sur ceux-ci, en cherchant à faire la preuve qu'une inhibition d'une ou des deux protéines candidates restaure l'expression de BIM et une ACAD normale. Ensuite, nous procéderons à des transfections des gènes mutés dans des lignées.

Pour les S-JMML, nous nous orientons en priorité vers des événements modificateurs de l'apoptose, pouvant avoir des effets post-traductionnels sur plusieurs protéines impliquées dans la cascade apoptotique. Sur le plan génétique, pour P4 l'implication d'une perte de fonction de l'IL12RB1 sera la première piste, pour P5 ce sera celle d'une perte de fonction de l'Intégrine Béta 2 et pour P6 celle d'une perte de fonction de DLC1. Pour ces trois patients, la disponibilité du matériel est limitée suite aux greffes de moelle voire au décès pour P6. La transfection ou mutagenèse dirigée devront être utilisées pour la suite des explorations.

Concernant les micro-ARNs, il sera intéressant d'approfondir l'étude en évaluant l'expression de ceux dont l'intérêt a été dégagé par notre étude préliminaire dans une plus grande cohorte de patients. Cette cohorte pourra éventuellement être agrandie par des patients atteints de S-JMML porteurs de mutations autres que *RAS*, en particulier de *PTPN11*. Une étude à plus grande échelle permettra d'isoler les micro-ARNs dont l'expression sera changée dans le même sens pour un grand nombre de patients. Ensuite, l'étude plus précise des cibles de ces derniers, par extinction ou surexpression dans des lignées, et des mécanismes par lesquels ils ont une influence sur la JMML ajoutera à la valeur pronostique qu'ils pourront apporter une valeur potentiellement thérapeutique.

La figure 36 récapitule les pistes évoquées ci-dessus.

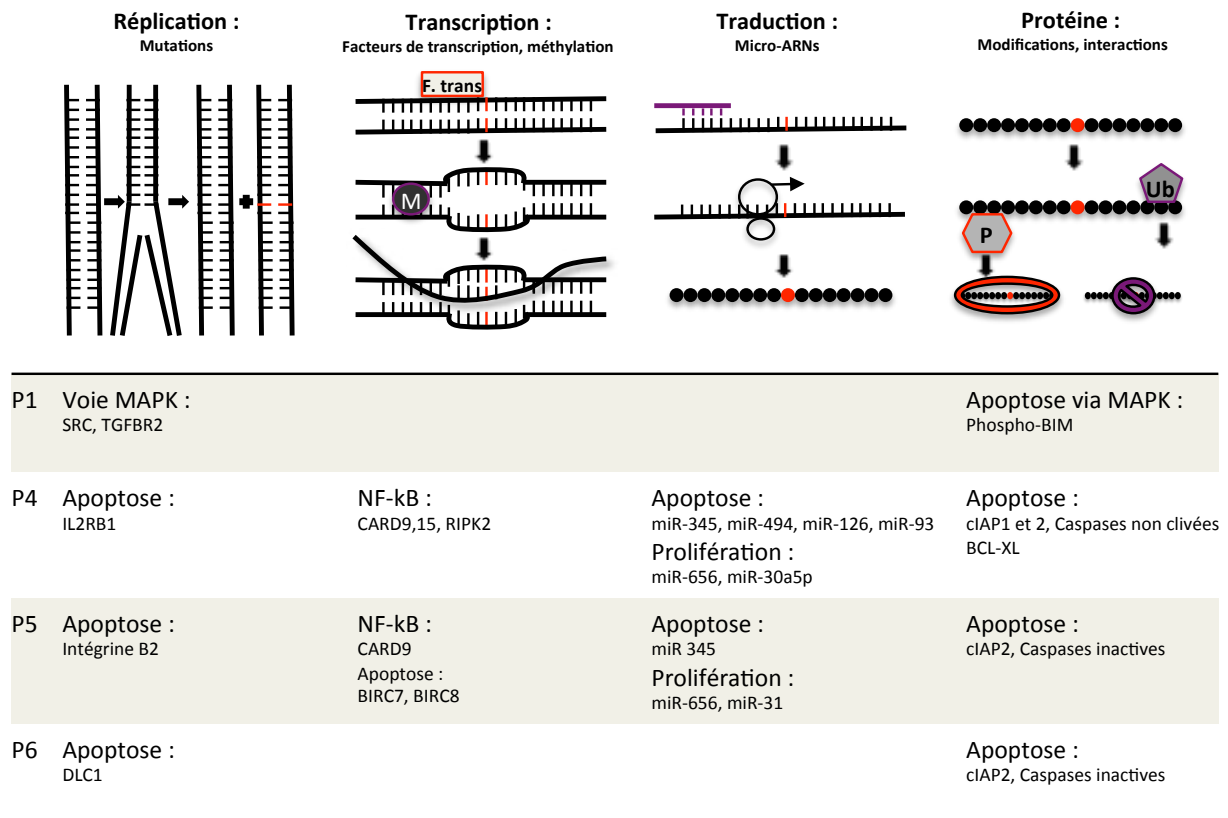


Figure 36 : Schéma récapitulatif des événements ajoutés aux mutations de *RAS* pouvant concourir à expliquer les différences phénotypiques observées

CONCLUSION

IV. CONCLUSION

Pour étudier les interactions entre apoptose lymphocytaire lors de la réponse immunitaire T et hyper activation de la voie RAS, nous nous sommes intéressés aux cellules de patients porteurs de mutations activatrices de *NRAS* et *KRAS* sur leurs lignées lymphoïde et myéloïde matures. Nous avons évalué leurs capacités à contrôler la prolifération déclenchée par le contact antigénique *in vitro* avec les tests fonctionnels d'ACAD et AICD. En fonction de nos résultats, nous avons approfondi les explorations par la biologie moléculaire et la biochimie. L'ensemble des données rassemblées suite à ces expérimentations nous mène à plusieurs conclusions.

Tout d'abord, nous remettons en question la distinction formelle entre RALD, LS-JMML et S-JMML. Il apparaît effectivement qu'il existe un continuum et non trois entités distinctes. Ce sont des événements additionnels qui interviennent au sein de ce continuum et déterminent l'évolution des patients.

Des patients présentant une JMML indolente, nous tirons l'enseignement que bien que la mutation de *RAS* soit présente dans leurs cellules T et qu'on y détecte de fortes quantités de protéine RAS active, la protéine BIM elle n'est pas diminuée et l'ACAD est normale. Nous en concluons que la mutation de *RAS* à elle seule ne suffit pas à entraîner le phénotype décrit classiquement dans les RALD.

Du patient présentant un RALD, nous avons appris que le phénotype fonctionnel et biochimique attribué à la mutation de *RAS* dans la littérature est, dans ce cas pour le moins, induit par un autre événement, présent sur la lignée fibroblastique, intervenant également dans la voie de signalisation des MAPK/ERK. Il est possible que cet événement suffise à induire le phénotype sur la lignée fibroblastique mais qu'une coopération avec la mutation de *RAS* soit nécessaire au niveau de la lignée lymphocytaire. Nous avons identifié deux gènes candidats très probables, *c-SRC* et *TGFBR2*.

Nous avons mis en évidence un défaut d'AICD chez les patients atteints de JMML sévère, permettant de les discriminer des patients LS-JMML sur le plan biologique. Nous

l'attribuons à un défaut des caspases initiatrices comme effectrices, indépendant de la mutation de *RAS* mais soumis à l'action des IAPs. Il nous semble donc cohérent de conclure qu'il existe un événement primitif, ayant une incidence sur l'apoptose dépendante des caspases, auquel s'ajoutent les mutations de *RAS*. Nous n'avons pas de piste forte au niveau de la méthylation de l'ADN suite à nos premières investigations. Nous avons des perspectives pertinentes au niveau de la transcription de certains ARN messagers, de l'expression anormale de certains micro-ARNs et de variations génétiques. Ces anomalies auraient une influence sur la voie RAS pour le RALD et sur la régulation post-traductionnelle des protéines régulatrices de l'apoptose pour les S-JMMLs. La preuve de leur implication et leur identification plus détaillée prolongera ce projet.

Enfin, nous pouvons dégager des pistes thérapeutiques de ce travail. Ainsi, l'ACAD déficiente dans le RALD semble bien être en rapport avec une phosphorylation anormale de ERK, ce quelle qu'en soit la cause. Des inhibiteurs de l'action de ERK phosphorylée sembleraient donc appropriés pour le traitement de patients présentant un RALD. A l'opposé, l'AICD déficiente des patients S-JMML est indépendante d'une phosphorylation anormale de ERK mais liée à un défaut des caspases. Tant que les causes précises de ce défaut, qui semblent uniques à chaque patient, n'ont pas été identifiées, l'utilisation de molécules inductrices de l'apoptose indépendante des caspases semble être une piste licite.

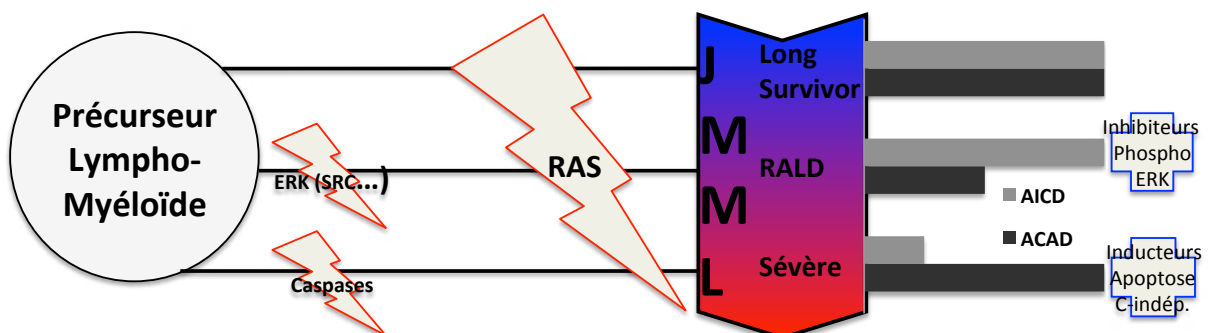


Figure 37 : Représentation schématique des conclusions du travail

ANNEXES

V. ANNEXES

A. Article 1 sous forme publiée

blood

2014 123: 1960-1963
doi:10.1182/blood-2014-01-548958

***RAS*-associated lymphoproliferative disease evolves into severe juvenile myelo-monocytic leukemia**

Nina Lanzarotti, Julie Bruneau, Amélie Trinquand, Marie-Claude Stolzenberg, Bénédicte Neven, Julien Fregeac, Eva Levy, Nadia Jeremiah, Felipe Suarez, Nizar Mahlaoui, Alain Fischer, Aude Magerus-Chatinet, Hélène Cavé and Frédéric Rieux-Laucat

Updated information and services can be found at:
<http://bloodjournal.hematologylibrary.org/content/123/12/1960.full.html>

Articles on similar topics can be found in the following Blood collections
[Lymphoid Neoplasia \(1656 articles\)](#)
[Myeloid Neoplasia \(1140 articles\)](#)
[Pediatric Hematology \(305 articles\)](#)

Information about reproducing this article in parts or in its entirety may be found online at:
http://bloodjournal.hematologylibrary.org/site/misc/rights.xhtml#repub_requests

Information about ordering reprints may be found online at:
<http://bloodjournal.hematologylibrary.org/site/misc/rights.xhtml#reprints>

Information about subscriptions and ASH membership may be found online at:
<http://bloodjournal.hematologylibrary.org/site/subscriptions/index.xhtml>

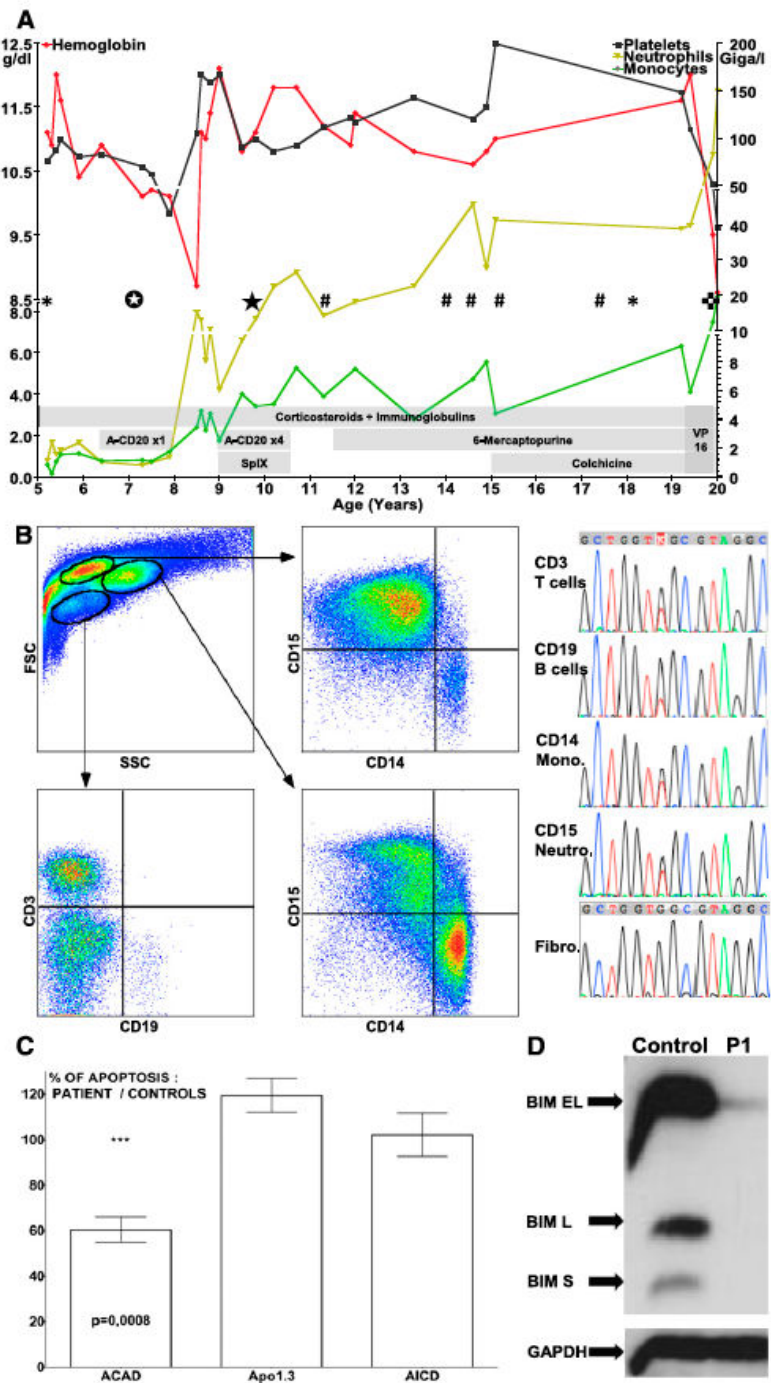
To the editor:

***RAS*-associated lymphoproliferative disease evolves into severe juvenile myelo-monocytic leukemia**

In juvenile myelomonocytic leukemia (JMML), activating *RAS* mutations are responsible for a hyperactive *RAS*/ERK signaling.¹ Somatic codons 12-13-61 *RAS* mutations are described in cases of *RAS*-associated lymphoproliferative disease (RALD),²⁻⁴ believed to be a benign entity distinct from JMML. RALD features autoimmune

cytopenias and lymphoproliferation secondary to a T-cell apoptosis defect, similar to autoimmune lymphoproliferative syndrome (ALPS). In RALD, the apoptosis defect is caused by a *RAS*/ERK-mediated downregulation of the proapoptotic BIM protein,²⁻⁴ whereas in ALPS, the defect is caused by mutations of the death receptor *FAS*.⁵ Thus,

Figure 1. Biological, phenotypal, molecular and functional analyses. (A) Hematobiological evolution of the patient with treatment courses. A-CD20, rituximab; SplX, splenectomy; VP16, etoposide; *, pneumonia; #, pericarditis associated to arthritis; ☆, colic B-cell proliferation; ★, Evans syndrome aggravation with spleen enlargement crisis and circulating B-cell proliferation; ✱, acute myeloproliferation with pulmonary infiltration leading to death. (B) Cell sorting and sequencing of circulating leukocytes populations and primary derived fibroblasts. Fibro., fibroblasts; Mono., monocytes; Neutro., neutrophils. (C) In vitro apoptosis assays on superantigen stimulated T cells from the patient; results are compared with controls. ACAD, activated cells autonomous death using cytokines withdrawal; AICD, activation-induced cell death by T-cell receptor restimulation; Apo1.3, direct Fas stimulation with an agonist antibody. (D) Western blot of patient's (P1) Bim expression on activated T cells. GAPDH, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase.



the same oncogenic hematopoietic *RAS* mutations are associated with different phenotypes, considered as distinct pathologies. We report a case of G13C *KRAS* mutation firstly leading to RALD and then evolving from an indolent to an aggressive form of leukemia.

The patient presented with autoimmune hemolytic anemia and thrombocytopenia, hepatosplenomegaly, and multifocal lymphadenopathy

at age 5. He developed a colic B-cell lymphoproliferation at age 7.5. At age 9.5, he underwent splenectomy and received 4 anti-CD20 infusions. From then on, the Evans syndrome declined and the leukocyte numbers rose. At age 20, he presented with chest pain and leucocytosis. The situation evolved into fatal acute respiratory distress syndrome secondary to pulmonary leucostasis (Figure 1A).

The patient initially displayed classical RALD features. ALPS was ruled out after eliminating a *FAS* mutation. A somatic *KRAS* G13C mutation was found in all circulating hematopoietic cells subsets but not on primary derived fibroblasts (Figure 1B). Consistent with published data,²⁻⁴ BIM was downregulated in activated T cells (Figure 1C), leading to an in vitro defect of activated cell autonomous death (Figure 1D). Interestingly, lymph node histology showed Rosai-Dorfman-like features when biopsied at age 6, an aspect not yet described in RALD (supplemental Figure 1A-C on the *Blood* Web site).

After splenectomy, the patient started displaying classical JMML features with increasing peripheral myeloid cell numbers. In addition to ALPS features, the spleen showed an important immature myeloid colonization (supplemental Figure 1D-E). The blood smear showed circulating dysplastic neutrophils and abnormal monocytes (supplemental Figure 1F-G). The bone marrow was hypercellular with granulocytic hyperplasia without blast excess at ages 5 and 19 (supplemental Figure 1H-I). Spontaneous growth and hypersensitivity to granulocyte macrophage-colony-stimulating factor of the bone marrow progenitors were found. Rearrangement of the *BCR-ABL* fusion gene was always negative. The JMML evolved during a 10-year period as a "long survivor," but the final stage was a classical feature seen in severe JMML.⁶

Autoimmunity has recently been reported in spontaneous remission cases of JMML with persistent *RAS*-mutated clones.⁷ We now show that RALD can be the initial presentation of a severe JMML. Moreover, the patient's history shows that 1 *RAS* mutation associates with the 3 different possible phenotypes (RALD and indolent and severe JMML). We thus postulate that RALD and JMML are not distinct entities but a continuum with additional genetic or epigenetic events contributing to the clinical phenotype and evolution. Therefore, close monitoring of such patients is recommended, and further efforts are needed to elucidate the additional factors.

Nina Lanzarotti

INSERM UMR 1163,

Laboratory of Immunogenetics of Pediatric Autoimmune Diseases,
Paris, France

Paris Descartes-Sorbonne Paris Cité University, Imagine Institute,
Paris, France

Département de Biothérapie, Hôpital Necker-Enfants Malades,
Assistance Publique-Hôpitaux de Paris,
Paris, France

Julie Bruneau

Paris Descartes-Sorbonne Paris Cité University, Imagine Institute,
Paris, France

Service Anatomie et Cytologie Pathologiques,
Hôpital Necker-Enfants Malades, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris,
Paris, France

Cytokines, Hématopoïèse et Réponse Immune,
Centre National de la Recherche Scientifique UMR8147,
Hôpital Necker-Enfants Malades, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris,
Paris, France

Amélie Trinquand

Différenciation Lymphoïde Normale et Pathologique,
Centre National de la Recherche Scientifique UMR8147,
Hôpital Necker-Enfants Malades, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris,
Paris, France

Service d'Hématologie Biologique, Hôpital Necker-Enfants Malades,
Assistance Publique-Hôpitaux de Paris,
Paris, France

Marie-Claude Stolzenberg

INSERM UMR 1163,

Laboratory of Immunogenetics of Pediatric Autoimmune Diseases,
Paris, France

Paris Descartes-Sorbonne Paris Cité University, Imagine Institute,
Paris, France

Bénédicte Neven

INSERM UMR 1163,

Laboratory of Immunogenetics of Pediatric Autoimmune Diseases,
Paris, France

Paris Descartes-Sorbonne Paris Cité University, Imagine Institute,
Paris, France

Service d'Immuno-Hématologie Adulte, Hôpital Necker-Enfants Malades,
Assistance Publique-Hôpitaux de Paris,
Paris, France

Julien Fregeac

INSERM UMR 1163,

Laboratory of Immunogenetics of Pediatric Autoimmune Diseases,
Paris, France

Paris Descartes-Sorbonne Paris Cité University, Imagine Institute,
Paris, France

Eva Levy

INSERM UMR 1163,

Laboratory of Immunogenetics of Pediatric Autoimmune Diseases,
Paris, France

Paris Descartes-Sorbonne Paris Cité University, Imagine Institute,
Paris, France

Nadia Jeremiah

INSERM UMR 1163,

Laboratory of Immunogenetics of Pediatric Autoimmune Diseases,
Paris, France

Paris Descartes-Sorbonne Paris Cité University, Imagine Institute,
Paris, France

Felipe Suarez

Cytokines, Hématopoïèse et Réponse Immune, CNRS UMR8147,
Hôpital Necker-Enfants Malades, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris,
Paris, France

Service d'Immuno-Hématologie Adulte, Hôpital Necker-Enfants Malades,
Assistance Publique-Hôpitaux de Paris,
Paris, France

Nizar Mahlaoui

Paris Descartes-Sorbonne Paris Cité University, Imagine Institute,
Paris, France

Service d'Immuno-Hématologie Adulte, Hôpital Necker-Enfants Malades,
Assistance Publique-Hôpitaux de Paris,
Paris, France

Centre de Référence des Déficiences Immunitaires Héritaires,
Hôpital Necker-Enfants Malades, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris,
Paris, France

Alain Fischer

INSERM UMR 1163,

Paris, France
Paris Descartes-Sorbonne Paris Cité University, Imagine Institute,
Paris, France

Unité d'Immuno-Hématologie et Rhumatologie Pédiatrique,
Hôpital Necker-Enfants Malades, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris,
Paris, France

Aude Magerus-Chatinet

INSERM UMR 1163,

Laboratory of Immunogenetics of Pediatric Autoimmune Diseases,
Paris, France

Paris Descartes-Sorbonne Paris Cité University, Imagine Institute,
Paris, France

Hélène Cavé

Département de Génétique, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris,
Hôpital Robert Debré,
Paris, France

Université Paris-Diderot,
Paris, France

Frédéric Rieux-Laucat

INSERM UMR 1163,

Laboratory of Immunogenetics of Pediatric Autoimmune Diseases,
Paris, France

Paris Descartes-Sorbonne Paris Cité University, Imagine Institute,
Paris, France

The online version of this article contains a data supplement.

Acknowledgments: This work was funded by grants from INSERM (to F.R.-L.), The European Research Council (ERC PIDIMMUN N°249816) (to A.F.), Association pour la Recherche contre le Cancer (SF20121205717) (to A.M.-C.). This program has received a state subsidy managed by the National Research Agency under the "Investments for the Future" program bearing the reference ANR-10-IAHU-01 and IDEX Sorbonne Paris Cité (SPC/JFG/2013-031) (to F.R.-L.). The authors are grateful to Prof L. Lament for providing the patient's biological specimen.

Contribution: N.L. designed research, performed research, analyzed data, and wrote the paper; J.B., A.T., and M.-C.S. performed research and analyzed data; B.N. designed research and analyzed data; J.F., E.L., and N.J. performed research; F.S., N.M., and A.F. participated in clinical care; A.M.-C. designed research and analyzed data; and H.C. and F.R.-L. designed research and wrote the paper.

Conflict-of-interest disclosure: The authors declare no competing financial interests.

Correspondence: Frédéric Rieux-Laucat, Institut Imagine, INSERM UMR 1163, 24 Bd du Montparnasse, 75015 Paris, France; e-mail: frederic.riex-laucat@inserm.fr.

References

1. Shannon K, Li Q. Oncogenic Ras scales the ALPS. *Blood*. 2011;117(10):2747-2748.
2. Oliveira JB, Bidère N, Niemela JE, et al. NRAS mutation causes a human autoimmune lymphoproliferative syndrome. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2007; 104(21):8953-8958.
3. Niemela JE, Lu L, Fleisher TA, et al. Somatic KRAS mutations associated with a human nonmalignant syndrome of autoimmunity and abnormal leukocyte homeostasis. *Blood*. 2011;117(10):2883-2886.
4. Takagi M, Shinoda K, Piao J, et al. Autoimmune lymphoproliferative syndrome-like disease with somatic KRAS mutation. *Blood*. 2011;117(10):2887-2890.
5. Rieux-Laucat F, Le Deist F, Hivroz C, et al. Mutations in Fas associated with human lymphoproliferative syndrome and autoimmunity. *Science*. 1995; 268(5215):1347-1349.
6. Gustafsson B, Hellebostad M, Iversen M, Sander B, Hasle H. Acute respiratory failure in 3 children with juvenile myelomonocytic leukemia. *J Pediatr Hematol Oncol*. 2011;33(8):e363-e367.
7. Takagi M, Piao J, Lin L, et al. Autoimmunity and persistent RAS-mutated clones long after the spontaneous regression of JMML. *Leukemia*. 2013;27(9):1926-1928.

© 2014 by The American Society of Hematology

B. Article 3 sous forme publiée

Seminars in Arthritis and Rheumatism 43 (2013) 217–219



Contents lists available at ScienceDirect

Seminars in Arthritis and Rheumatism

journal homepage: www.elsevier.com/locate/semarthrit

Are RASopathies new monogenic predisposing conditions to the development of systemic lupus erythematosus? Case report and systematic review of the literature[☆]

Brigitte Bader-Meunier, MD^{a,b,c,*}, Hélène Cavé, MD, PhD^{d,e}, Nadia Jeremiah, PhD^{a,b,c},
Aude Magerus, PhD^{b,c}, Nina Lanzarotti, MD^{b,c}, Frédéric Rieux-Laucat, PhD^{b,c},
Valérie Cormier-Daire, MD, PhD^{c,f,g}

^a Department of Pediatric Immunology and Rheumatology, Necker enfants malades Hospital, Paris, France^b INSERM U768, France^c Imagine foundation, France^d Department of Genetics, AP-HP-Robert Debré Hospital and Paris-Diderot University, Paris, France^e INSERM UMR_S940, University Hematology Institut, Paris, France^f Department of Medical Genetics, Paris Descartes-Sorbonne Paris Cité University, Paris, France^g INSERM U781, France

ARTICLE INFO

Keywords:
Lupus
Noonan
RASopathies

ABSTRACT

Objective: RASopathies (Noonan syndrome (NS) and Noonan-related syndromes) are neurodevelopmental syndromes resulting from germline mutations in genes that participate in the rat sarcoma/mitogen-activated protein kinases (RAS/MAPK) pathway (PTPN11, SOS1, RAF, KRAS or NRAS, and SHOC2). Some monogenic conditions are associated with the development of systemic lupus erythematosus (SLE), and a few reports described the association of SLE with NS. We aim to search for a relationship between RASopathy and the development of SLE.

Methods: We reported for the first time a case of 13-year-old boy with NS with loose anagen hair (NSLAH) resulting from mutation in SHOC2 who developed an autoimmune disorder that fulfilled four American College of Rheumatology (ACR) criteria for the classification of SLE (polyarthritis, pericarditis, antinuclear antibodies, and anti-DNA antibodies). The case report then prompted a literature review by a systematic search for English and French articles on the subjects of RASopathies and SLE that had English abstracts in PubMed from 1966 to 2012.

Results: We identified seven additional patients with RASopathy and SLE. The male-to-female ratio was 1:1 and age at onset of SLE ranged from 5 to 32 years. The most common features were polyarthritis (7/8 patients), autoimmune cytopenia (4/8 patients), and pericarditis (4/8 patients) while only one patient presented with skin involvement.

Conclusion: The association of two rare diseases in eight patients suggests that RASopathies may be associated with the development of SLE, which is characterized by a higher male-to-female ratio, a lower rate of skin involvement, and a higher rate of pericarditis than "classic" SLE.

© 2013 Elsevier Inc. All rights reserved.

Genetic factors confer a predisposition to the development of systemic lupus erythematosus (SLE). SLE is commonly considered to be a polygenic disorder. However, it may be also associated with mutations in single genes, in Aicardi-Goutières syndrome (AGS), spondylenchondrodysplasia (SPENCD), defects in the classical pathway of complement activation, in disorder related to

DNASE1L3 mutation, and in chronic granulomatosis disease [1]. Recently, Y. Crow suggested that SLE is not a single disease, and may rather comprise, to some extent, a heterogeneous collection of rare monogenic disorders [1]. A few reports described the association of Noonan syndrome (NS, OMIM: 163950), classified as a RASopathy with autoimmune features, including SLE [2–8]. RASopathies are autosomal dominant neurodevelopmental syndromes resulting from germline mutations in genes that participate in the rat sarcoma/mitogen-activated protein kinases (RAS/MAPK) pathway, an important signal transduction pathway through which extracellular ligands stimulate cell proliferation, differentiation, survival, and metabolism [9]. They comprise NS

[☆]Funding statement: This work was funded by a grant from the Arthritis foundation Courtin.

* Corresponding author at: Service d'Immunologie et Rhumatologie pédiatrique, Hôpital Necker-Enfants malades, 149 rue de Sèvres, 75015 Paris, France.

E-mail address: brigitte.bader-meunier@nck.aphp.fr (B. Bader-Meunier).

Table 1

Demographic, clinical, and biological features in patients with RASopathy and SLE

Ref.	Sex/age at onset of SLE	Manifestations of SLE at onset of disease	Other clinical features ^a	Other autoimmune manifestations	Nature of the RASopathy (Mutation)
Present case	M/13 y	Polyarthritis, pericarditis, ANA, and anti-dsDNA Ab	Hepatomegaly, splenomegaly, and lymphadenopathy	LAC	NSLAH (<i>SHOC</i>)
[6]	M/11 y	Polyarthritis, oral ulcers, thrombocytopenia, ANA, and anti-dsDNA Ab	–	APL Ab	NS (Not searched)
[8]	M/17 y	Recurrent fever, polyarthritis, oral ulcers, alopecia, pericarditis, seritis, renal insufficiency, and ANA	Hepatomegaly and splenomegaly	–	NS (Not Searched)
[7]	F/26 y	Arthralgia, pericarditis, Coombs-positive hemolytic anemia, ANA, anti-dsDNA, and anti-Sm Ab	–	Celiac disease, Hashimoto thyroiditis, LAC, and ACL Ab	NS (Not Searched)
[5]	F/5 y	Lupus nephritis WHO class IV, thrombocytopenia, Coombs-positive hemolytic anemia, cerebral vasculitis, and ANA	–	ACL Ab	NS (<i>PTPN11</i> excluded)
[4]	M/28 y	Polyarthritis, pericarditis, lymphopenia, ANA (1:1,280), and Anti-DNA Ab	–	Hashimoto thyroiditis	NS (Not searched)
[2]	F/32 y	Polyarthritis, photosensitivity, ANA (1:320), leukopenia, and lymphopenia	–	Hashimoto thyroiditis	NS (<i>PTPN11</i>)
[3]	F/18 y	Polyarthritis, rash, thrombocytopenia, Coombs-positive hemolytic anemia, ANA, and anti-DNA Ab	–	–	NS (<i>KRAS</i>)

SLE: systemic lupus erythematosus; ANA: antinuclear antibodies; Ab: antibody; anti-dsDNA: anti-double stranded DNA; APL: antiphospholipid; LAC: lupus anticoagulant; ACL: anticardiolipin; NS: Noonan syndrome; NSLAH: NS with loose anagen hair.

^a Excluding RASopathies-related malformations and dysmorphia.

and several Noonan-related syndromes, such as NS with loose anagen hair (NSLAH, OMIM: 607721), and their cardinal features include craniofacial dysmorphism, short stature, cardiac malformation, variable cognitive delay, and an increased risk of cancer development [9]. Mutations in eight genes are estimated to account for at least 70% of affected individuals (*PTPN11*, *SOS1*, *KRAS*, *NRAS*, *RAF1*, *BRAF*, *SHOC2*, *CBL*, and *SHOC2* (NSLAH)). We herein describe for the first time the development of SLE in a child harboring a mutation in *SHOC2* and review the literature on patients with RASopathy and SLE.

Methods

We systematically searched English and French articles on the subjects of SLE and RASopathy that had English abstracts in PubMed from 1966 to 2012. The keywords used were “lupus” and “Noonan syndrome” or “lupus” and “RASopathy.” Patients were selected if they fulfilled American College of Rheumatology (ACR) classification criteria for SLE and if the diagnosis of RASopathy was made on characteristic clinical diagnosis criteria and/or DNA analysis. The articles found were reviewed in relation to demographic characteristics (sex and age), clinical characteristics (clinical presentation of SLE and onset of symptoms), immunologic markers, and germline mutations responsible for the RASopathy. We selected seven articles that were all able to respond to our study question, and we did not exclude any report.

Case report

A 13-year-old boy with NSLAH was referred to our pediatric rheumatology center for management of pericarditis. The diagnosis of NSLAH was made on the basis of the presence stature retardation treated with growth hormone (GH) from 10 years of age, characteristic facial dysmorphism, darkly pigmented skin, and sparse and thin hair. A heterozygous mutation in *SHOC2* (c.4A > G, p.Ser2Gly) was identified in DNA obtained from peripheral blood. Physical examination revealed polyarthritis and massive lymphadenopathy and hepatosplenomegaly. Laboratory investigations showed normal whole blood cell count and

C-reactive protein value and a high sedimentation rate of 33 mm/h. Renal function and urinalysis were normal. Immunological studies showed positive antinuclear antibody (ANA) (1:800), positive anti-double-stranded DNA (anti-ds DNA) (39 UI/ml, normal value < 5.5) and lupus anticoagulant. Serum levels of complements were normal (CH50, C3, C4). Anticardiolipin (aCL) IgG/IgM, anti-b2 glycoprotein I (anti-b2GPI), anti-Ro, and anti-Sm were negative (Table 1). Echocardiography revealed a mild pericardial effusion. Thus, the patient fulfilled four ACR criteria for SLE (polyarthritis, pericarditis, antinuclear antibodies, and anti-DNA antibodies). He was treated with hydroxychloroquine and Aspirin. Six months after initiation of treatment, arthritis and pericarditis have remitted. However, lymphadenopathy and hepatosplenomegaly were persistent.

Results

Seven patients with RASopathy and SLE were identified in our review of the literature (Table 1). The male-to-female ratio was 1:1 and age at onset of SLE ranged from 5 to 32 years. The most common features were polyarthritis (6/7 patients), autoimmune cytopenia (4/7 patients), and pericarditis (3/7 patients) while only one patient presented with skin involvement. Other features included nephritis (2/7), buccal ulceration (2/7), cerebral vasculitis (1/7), alopecia (1/7), and photosensitivity (1/7). Autoantibodies consisted of ANA (7/7 patients), anti-ds DNA (4/7), and antiphospholipid antibodies (3/7). Of note, three patients had also another autoimmune disease (Hashimoto thyroiditis, celiac disease), and one patient had a benign lymphoproliferative disease. None of these patients had a family history of autoimmune disease. A mutation was identified in three patients, consisting in mutations in *PTPN11* and *KRAS*.

Discussion

Systemic lupus erythematosus (SLE) results from the complex interaction between genetic and environmental factors. It is usually thought that SLE results from the combined effect of variants in a large number of genes, and several genome wide association studies (GWAS) have identified many single-nucleotide

polymorphisms (SNPs) associated with SLE [10]. However, the loci identified so far can account for only about 15% of the heritability of SLE [1]. Beside the role of these risk alleles in the pathogenesis of SLE, a few Mendelian conditions have been associated with high risk of SLE [1]. They comprised Aicardi-Goutières syndrome (AGS), resulting from mutations identified in six genes (encoding the 3-repair DNA exonuclease 1 (TREX1), the three subunits of the ribonuclease H2 complex (RNASEH2B, RNASEH2C, and RNASEH2A), sterile alpha motif domain and HD domain-containing protein 1 (SAMHD1), and adenosine deaminases acting on RNA (ADARs)) [11,12,18]; spondylenchondrodysplasia (SPENCD), resulting from a tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) deficiency [13,14]; some congenital complement deficiencies (C1q, C1s, C1r, C2, and C4 deficiencies) [15]; mutation in DNASE1L3, a DNase I [16]; and chronic granulomatous disease [17]. In most of these conditions, SLE has a pediatric onset and its features differ from those of the common form of SLE and/or is associated with disease-defining features. Indeed, chilblain lupus is frequent in AGS, a high frequency of anti-neutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA) and of lupus nephritis is observed in carriers of DNASE1L3 mutation, and C1q, C1s, C1r deficiencies are associated with a very early and often severe SLE. Disease-defining features comprise demyelination and CNS inflammation in AGS, bone dysplasia in SPENCD, and recurrent and/or severe infections in congenital complement deficiencies and chronic granulomatous disease. Thus, SLE phenotype heterogeneity could be related to genetic heterogeneity, and a collection of rare monogenic disorders might be responsible for some of the disorders lumped under the term SLE, especially of pediatric-onset SLE [1].

RASopathies are rare neurodevelopmental syndromes that include NSLAH [9], characterized by severe GH deficiency and loose anagen hair, sometimes associated with hypernasal voice, and darkly pigmented skin. Considering the present case and the review of the literature, we identified eight patients with a RASopathy and SLE (Table 1). A relationship between autoimmunity and RASopathies has been recently highlighted by the presence of autoimmune antibodies in 52% of 42 patients with RASopathies, including 39% of 37 NS patients [2]. The presence of ANA and lupus anticoagulant were detected in five and three of these 22 patients, respectively, including a 32-year-old female who had SLE (Table 1). Interestingly, somatic mutations in NRAS or KRAS had been identified in four patients who had a new disease entity of RAS-associated autoimmune lymphoproliferative syndrome (ALPS)-like disease (RALD) [19,20]. Patients with RALD were characterized by massive lymphadenopathy and/or hepatosplenomegaly and autoimmunity, including the presence of ANA, lupus anticoagulant, anticardiolipin, and anti- β_2 glycoprotein 1 [19,20]. Thus, germinal and/or somatic mutations in genes involved in the RAS/MAPK pathway might be involved in the pathogenesis of autoimmune diseases. The prevalence of NS and SLE is approximately 1/2000 births and 15–200/100 000 persons, respectively. The association of these two rare diseases in eight patients and the high overall percentage of patients with NS who have autoimmune features suggest that they might be related and that RASopathies must be added to this growing list of monogenic conditions associated with the development of autoimmune diseases, including SLE.

In the common form of SLE, the male-to-female ratio varies among cohorts but is generally estimated at about 9:1 in adult-onset disease and the skin disease is the commonest involvement (30–76%) [21]. Among this series of eight patients who present with both RASopathy and SLE, all the classic eleven ACR criteria of SLE but one (discoid lupus) were fulfilled. In addition, a lymphoproliferative syndrome, consistent with the diagnosis of RALD, was present in two patients and Hashimoto thyroiditis was present in 4/8 patients. The

male-to-female ratio was 1:1 and SLE developed in adults as well as in children. The commonest manifestations were polyarthritis (6/8 patients), pericarditis (4/8 patients), and autoimmune cytopenia (4/8 patients), while only one patient presented with skin involvement. It must be emphasized that our patient had a remarkably benign course requiring minimal medications considering that this was childhood-onset SLE. Unfortunately, the course of SLE was not detailed in the pediatric reports of literature, and it cannot be stated if the course of RASopathy-related SLE differs or not from the course of "classic" pediatric SLE. Thus, SLE differs from classic SLE presentation by a higher male-to-female ratio of 1:1, a lower rate of skin involvement (1/8 patients), a frequent pericarditis (4/8 patients), and the occurrence of a benign lymphoproliferative disorder in some patients.

Thus, we suggest that RASopathy may predispose to the development of SLE, and that this autoimmune disorder differs from the common form of SLE. These data support the hypothesis that different disorders are lumped under the term of SLE. RASopathy may help define the role of defects of the RAS/MAPK pathways in the causation of autoimmunity in a subgroup of patients with SLE.

References

- [1] Crow VJ. Lupus: how much "complexity" is really (just) genetic heterogeneity? *Arthritis Rheum* 2011;63(12):3661–4.
- [2] Quao CR, Carvalho JF, da Silva CA, Bueno C, Brasil AS, Pereira AC, et al. Autoimmune disease and multiple autoantibodies in 42 patients with RASopathies. *Am J Med Genet A* 2012;158A(5):1077–82.
- [3] Leventopoulos G, Denayer E, Makrythanasis P, Papapolychiou C, Fryssira H. Noonan syndrome and systemic lupus erythematosus in a patient with a novel KRAS mutation. *Clin Exp Rheumatol* 2010;28(4):556–7.
- [4] Lisboa MP, Moreno M, Orellana C, Gratacos J, Larrosa M. Noonan syndrome associated with systemic lupus erythematosus. *Lupus* 2009;18(3):267–9.
- [5] Lopez-Rangel E, Malleson PN, Lirenman DS, Roa B, Wisniewska J, Lewis MES. Systemic lupus erythematosus and other autoimmune disorders in children with Noonan syndrome. *Am J Med Genet A* 2005;139(3):239–42.
- [6] Alaraj Y, Balci S, Ozen S. Noonan syndrome and systemic lupus erythematosus: presentation in childhood. *Clin Dysmorphol* 2004;13(3):161–3.
- [7] Amoroso A, Garzia P, Vadacca M, et al. The unusual association of three autoimmune diseases in a patient with Noonan syndrome. *J Adolesc Health* 2003;32(1):94–7.
- [8] Martin DM, Gencayuz CE, Petty EM. Systemic lupus erythematosus in a man with Noonan syndrome. *Am J Med Genet* 2001;102(1):59–62.
- [9] Tartaglia M, Gelb BD, Zenker M. Noonan syndrome and clinically related disorders. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2011;25(1):161–79.
- [10] Bolos GC. Systemic lupus erythematosus. *New Engl J Med* 2011;365:2110–21.
- [11] Rice G, Patrick T, Parmar R, et al. Clinical and molecular phenotype of Aicardi-Goutières syndrome. *Am J Hum Genet* 2007;81:713–25.
- [12] Rice GI, Kasher PR, Forte GM, Marnion NM, Greenwood SM, Szymkiewicz M, et al. Mutations in ADAR1 cause Aicardi-Goutières syndrome associated with a type I interferon signature. *Nat Genet* 2012;44(11):1243–8.
- [13] Briggs TA, Rice GI, Daly S, et al. Tartrate-resistant acid phosphatase deficiency causes a bone dysplasia with autoimmunity and a type I interferon expression signature. *Nat Genet* 2011;43:127–31.
- [14] Lausch E, Janede A, Bros M, Tjoandt S, Alaraj Y, De Laet C, et al. Genetic deficiency of tartrate-resistant acid phosphatase associated with skeletal dysplasia, cerebral calcifications and autoimmunity. *Nat Genet* 2011;43:132–7.
- [15] Dragon-Durey MA, Fremeaux-Bacchi V. Complement component deficiencies in human disease. *Presse Med* 2006;35(5 Pt 2):861–70.
- [16] Al-Mayouf SM, Sunkar A, Abdwar R, et al. Loss-of-function variant in DNASE1L3 causes a familial form of systemic lupus erythematosus. *Nat Genet* 2011;23(43):1186–8.
- [17] Manzi S, Urbach AH, McCune AB, Altman HA, Kaplan SS, Medsger TA Jr, et al. Systemic lupus erythematosus in a boy with chronic granulomatous disease: case report and review of the literature. *Arthritis Rheum* 1991;34:101–5.
- [18] Ramantani G, Kohlhaase J, Hertzberg C, Innes AM, Engel K, Hunger S, et al. Expanding the phenotypic spectrum of lupus erythematosus in Aicardi-Goutières syndrome. *Arthritis Rheum* 2010;62:1469–77.
- [19] Niemela JE, Lu L, Fleisher TA, et al. Somatic KRAS mutations associated with a human nonmalignant syndrome of autoimmunity and abnormal leukocyte homeostasis. *Blood* 2011;117(10):2883–6.
- [20] Takagi M, Shinoda K, Piao J. Autoimmune lymphoproliferative syndrome-like disease with somatic KRAS mutation. *Blood* 2011;117:2887–90.
- [21] O'Neill S, Cervera R. Systemic lupus erythematosus. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 2010;24(6):841–55.

C. LUMA

	Echantillon	A	C	T	C'	H2O	A'	T'
HpaII	P4	4,58	3,68	3,82	0,47	0,01	1,5	1,4
	P5	3,54	1,92	2,12	0,1	0,04	0,75	0,62
	P1	5,48	4,22	4,37	0,19	0,07	1,51	1,46
	P6	2,06	2,83	1,56	0,21	0,32	0,83	0,56
	P2	2,34	2,01	1,6	0,18	0,13	0,87	0,81
	Contrôle	6,5	5,47	5,94	0,28	0,09	2,34	2,18
MspI	P4	3,87	12,1	3,4	0,46	0,03	1,33	1,26
	P5	3,79	9,92	2,47	0,23	0,02	0,8	0,73
	P1	5,1	16,59	4,35	0,31	0,04	1,4	1,24
	P6	2,63	12,65	1,82	0,37	0,05	0,71	0,55
	P2	2,5	8,69	1,91	0,2	0,16	0,9	0,81
	Contrôle	7,68	25,5	6,83	0,52	0,06	2,34	2,09

Tableau 16 : Détails de l'analyse de la méthylation, par LUMA 1/2

	Echantillon	EcoRI (A+A')/ (T+T')	(A+A')	(T+T')	moy AT	HpaII/ EcoRI (C+C')/ moyAT	MspI/ EcoRI (C+C')/ moyAT
HpaII	P4	1,16	6,08	5,22	5,65	0,73	
	P5	1,57	4,29	2,74	3,52	0,57	
	P1	1,20	6,99	5,83	6,41	0,69	
	P6	1,36	2,89	2,12	2,51	1,21	
	P2	1,33	3,21	2,41	2,81	0,78	
	Contrôle	1,09	8,84	8,12	8,48	0,68	
MspI	P4	1,12	5,2	4,66	4,93		2,55
	P5	1,43	4,59	3,2	3,90		2,61
	P1	1,16	6,5	5,59	6,05		2,80
	P6	1,41	3,34	2,37	2,86		4,56
	P2	1,25	3,4	2,72	3,06		2,91
	Contrôle	1,12	10,02	8,92	9,47		2,75

Tableau 17 : Détails de l'analyse de la méthylation, par LUMA 2/2

D. Exome

Nom complet	AA	cDNA	Polyp	Sift
Amino peptidase-like 1	A293V	c.878C>T	0,996	-
Angiomotin like 2	R468Q	c.1403G>A	0,97	0,01
ATP-binding cassette A 1	M968T	c.2903T>C	0,678	-
C7orf55-LUC7L2 protein	H9P	c.26A>C	-	0,01
CDC42 binding protein kinase alpha	R1633C	c.4897C>T	0,845	-
Chromo domain helicase DNA binding protein 8	R171C	c.511C>T	0,993	-
Chromosome 19 open reading frame	V171A	c.512T>C	0,995	0,02
Coiled-coil domain containing	R433H	c.1298G>A	0,962	0,02
Collagen, type II, alpha	R1240W	c.3718C>T	-	0,02
CutA divalent cation tolerance homolog	N54K	c.162C>A	0,912	-
Docking protein 3	R121W	c.361C>T	0,992	-
EF-hand calcium binding domain 13	I400L	c.1198A>C	0,961	0,04
F-box protein 33	R54G	c.160C>G	-	0,05
FK506 binding protein 7	I113T	c.338T>C	0,988	-
Folypolyglutamate synthase	P583L	c.1748C>T	0,976	0,01
Gamma-glutamyl carboxylase	R260W	c.778C>T	0,999	-
General transcription factor IIIC, 1 alpha	G191A	c.572G>C	0,999	-
Glutamate receptor, ionotropic, N-methyl D-aspartate 2C	R516C	c.1546C>T	1	-
Kelch domain containing 4	Q400Stop	c.1198C>T	-	-
Lectin, galactoside-binding, soluble, 13	A51V	c.152C>T	0,939	0,04
Notch 4	P597L	c.1790C>T	0,999	-
nuclear receptor interacting protein 1	L505F	c.1513C>T	0,998	-
Olfactory receptor, 51, G, 2	R127H	c.380G>A	0,999	-
Perilipin 1	R512L	c.1535G>T	0,993	-
Phosphodiesterase 4C, cAMP-specific	D519G	c.1556A>G	0,958	-
Protocadherin alpha 9	G42R	c.124G>C	1	-
SH3-domain binding protein 1	E220G	c.659A>G	0,996	-
Solute carrier family 27 member 4	V536M	c.1606G>A	0,999	-
TAF3 RNA polymerase II, TATA box binding prot. associated factor	L525Stop	c.1574T>A	-	-
Transmembrane emp24 protein transport domain containing 8	R281Q	c.842G>A	1	-
Transmembrane protein 25	V82M	c.244G>A	0,997	0,02
Transmembrane protein 66	A186T	c.556G>A	0,959	0,01
Tripartite motif containing 65	W39Stop	c.116G>A	-	-
Trypsin domain containing 1	V19G	c.56T>G	0,998	-
Ubiquinol-cytochrome c reductase core protein I	R422C	c.1264C>T	0,996	-
Ubiquitin specific peptidase 40	L1012P	c.3035T>C	0,996	-
UBX domain protein 6	L395W	c.1184T>G	0,997	-
Vacuolar protein sorting 53 homolog	R80L	c.239G>T	0,987	0,01
Zinc finger protein 366	F374L	c.1120T>C	0,996	-

Tableau 18 : Variants de P4 non décrits susceptibles de modifier la fonction de la protéine mais dont la pertinence avec le phénotype clinique et biologique est faible.

BIBLIOGRAPHIE

VI. BIBLIOGRAPHIE

1. Joseph-Théophile de Mourcin De Meymi-Lanaugarie. *Lexique grec-français: contenant tous les mots des divers opuscules grecs et cours de versions grecques en usage dans les classes*. (Imprimerie d'Auguste Delalain, 1832).
2. Emile Littré. *Hippocrate, Oeuvres complètes*. **4**, (J.-B. Baillière, 1844).
3. Alexandre C. *Dictionnaire Grec – Français composé sur un nouveau plan*. (Hachette, 1836).
4. Diderot, Eidous, Toussaint. *Dictionnaire universel de médecine, de chirurgie, d'anatomie, de chimie, de pharmacie, de botanique, d'histoire naturelle, etc.* (1746).
5. Virchow R. in *Cell. Pathol. Based Physiol. Pathol. Histol.* (John Churchill, 1860).
6. Vogt K. *Untersuchungen über die Entwicklungsgeschichte der Geburtshelerkröte (Alytes obstetricians)*. (Solothurn, Jent und Gassmann, 1842).
7. Kerr, J. F., Wyllie, A. H. & Currie, A. R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer* **26**, 239–257 (1972).
8. Locksley, R. M., Killeen, N. & Lenardo, M. J. The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell* **104**, 487–501 (2001).
9. Rieux-Laucat, F. *et al.* Mutations in Fas associated with human lymphoproliferative syndrome and autoimmunity. *Science* **268**, 1347–1349 (1995).
10. Siegel, R. M. *et al.* Fas preassociation required for apoptosis signaling and dominant inhibition by pathogenic mutations. *Science* **288**, 2354–2357 (2000).
11. Algeciras-Schimmich, A. *et al.* Molecular ordering of the initial signaling events of CD95. *Mol. Cell. Biol.* **22**, 207–220 (2002).
12. Kischkel, F. C. *et al.* Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. *EMBO J.* **14**, 5579–5588 (1995).
13. Aggarwal, B. B. Signalling pathways of the TNF superfamily: a double-edged sword. *Nat. Rev. Immunol.* **3**, 745–756 (2003).
14. Stennicke, H. R. *et al.* Pro-caspase-3 is a major physiologic target of caspase-8. *J. Biol. Chem.* **273**, 27084–27090 (1998).
15. Lavrik, I. N. *et al.* CD95 stimulation results in the formation of a novel death effector domain protein-containing complex. *J. Biol. Chem.* **283**, 26401–26408 (2008).
16. Schleich, K. *et al.* Stoichiometry of the CD95 death-inducing signaling complex:

experimental and modeling evidence for a death effector domain chain model. *Mol. Cell* **47**, 306–319 (2012).

17. Riedl, S. J. & Shi, Y. Molecular mechanisms of caspase regulation during apoptosis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **5**, 897–907 (2004).
18. Strasser, A. The role of BH3-only proteins in the immune system. *Nat. Rev. Immunol.* **5**, 189–200 (2005).
19. Tsujimoto, Y., Finger, L. R., Yunis, J., Nowell, P. C. & Croce, C. M. Cloning of the chromosome breakpoint of neoplastic B cells with the t(14;18) chromosome translocation. *Science* **226**, 1097–1099 (1984).
20. Martinez-Caballero, S. *et al.* Assembly of the mitochondrial apoptosis-induced channel, MAC. *J. Biol. Chem.* **284**, 12235–12245 (2009).
21. Yang, J. *et al.* Prevention of apoptosis by Bcl-2: release of cytochrome c from mitochondria blocked. *Science* **275**, 1129–1132 (1997).
22. Zou, H., Henzel, W. J., Liu, X., Lutschg, A. & Wang, X. Apaf-1, a human protein homologous to *C. elegans* CED-4, participates in cytochrome c-dependent activation of caspase-3. *Cell* **90**, 405–413 (1997).
23. Li, P. *et al.* Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell* **91**, 479–489 (1997).
24. Bouillet, P. *et al.* Proapoptotic Bcl-2 relative Bim required for certain apoptotic responses, leukocyte homeostasis, and to preclude autoimmunity. *Science* **286**, 1735–1738 (1999).
25. Li, H., Zhu, H., Xu, C. J. & Yuan, J. Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell* **94**, 491–501 (1998).
26. Waterhouse, N. J. *et al.* A central role for Bid in granzyme B-induced apoptosis. *J. Biol. Chem.* **280**, 4476–4482 (2005).
27. Kaufmann, S. H., Desnoyers, S., Ottaviano, Y., Davidson, N. E. & Poirier, G. G. Specific proteolytic cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase: an early marker of chemotherapy-induced apoptosis. *Cancer Res.* **53**, 3976–3985 (1993).
28. D'Amours, D., Sallmann, F. R., Dixit, V. M. & Poirier, G. G. Gain-of-function of poly(ADP-ribose) polymerase-1 upon cleavage by apoptotic proteases: implications for apoptosis. *J. Cell Sci.* **114**, 3771–3778 (2001).
29. Eguchi, Y., Shimizu, S. & Tsujimoto, Y. Intracellular ATP levels determine cell death fate by apoptosis or necrosis. *Cancer Res.* **57**, 1835–1840 (1997).

30. Liu, X., Zou, H., Widlak, P., Garrard, W. & Wang, X. Activation of the apoptotic endonuclease DFF40 (caspase-activated DNase or nuclease). Oligomerization and direct interaction with histone H1. *J. Biol. Chem.* **274**, 13836–13840 (1999).
31. Coleman, M. L. *et al.* Membrane blebbing during apoptosis results from caspase-mediated activation of ROCK I. *Nat. Cell Biol.* **3**, 339–345 (2001).
32. Vahsen, N. *et al.* AIF deficiency compromises oxidative phosphorylation. *EMBO J.* **23**, 4679–4689 (2004).
33. Cheung, E. C. C. *et al.* Dissociating the dual roles of apoptosis-inducing factor in maintaining mitochondrial structure and apoptosis. *EMBO J.* **25**, 4061–4073 (2006).
34. Otera, H., Ohsakaya, S., Nagaura, Z.-I., Ishihara, N. & Mihara, K. Export of mitochondrial AIF in response to proapoptotic stimuli depends on processing at the intermembrane space. *EMBO J.* **24**, 1375–1386 (2005).
35. Susin, S. A. *et al.* Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature* **397**, 441–446 (1999).
36. Ye, H. *et al.* DNA binding is required for the apoptogenic action of apoptosis inducing factor. *Nat. Struct. Biol.* **9**, 680–684 (2002).
37. Li, L. Y., Luo, X. & Wang, X. Endonuclease G is an apoptotic DNase when released from mitochondria. *Nature* **412**, 95–99 (2001).
38. Nagata, S. Apoptosis by Death Factor. *Cell* **88**, 355–365 (1997).
39. Holler, N. *et al.* Fas triggers an alternative, caspase-8-independent cell death pathway using the kinase RIP as effector molecule. *Nat. Immunol.* **1**, 489–495 (2000).
40. Vonarbourg, C. *et al.* Differential sensitivity of Jurkat and primary T cells to caspase-independent cell death triggered upon Fas stimulation. *Eur. J. Immunol.* **32**, 2376–2384 (2002).
41. Kelliher, M. A. *et al.* The death domain kinase RIP mediates the TNF-induced NF-kappaB signal. *Immunity* **8**, 297–303 (1998).
42. Liu, Z. G., Hsu, H., Goeddel, D. V. & Karin, M. Dissection of TNF receptor 1 effector functions: JNK activation is not linked to apoptosis while NF-kappaB activation prevents cell death. *Cell* **87**, 565–576 (1996).
43. Varfolomeev, E. E. & Ashkenazi, A. Tumor necrosis factor: an apoptosis JuNKie? *Cell* **116**, 491–497 (2004).
44. Bodur, C. *et al.* Pramanicin analog induces apoptosis in human colon cancer cells: critical roles for Bcl-2, Bim, and p38 MAPK signaling. *PloS One* **8**, e56369 (2013).

45. Zhou, C., Pan, W., Wang, X. P. & Chen, T. S. Artesunate induces apoptosis via a Bak-mediated caspase-independent intrinsic pathway in human lung adenocarcinoma cells. *J. Cell. Physiol.* **227**, 3778–3786 (2012).
46. Schneiders, U. M., Schyschka, L., Rudy, A. & Vollmar, A. M. BH3-only proteins Mcl-1 and Bim as well as endonuclease G are targeted in spongistatin 1-induced apoptosis in breast cancer cells. *Mol. Cancer Ther.* **8**, 2914–2925 (2009).
47. Polster, B. M., Basañez, G., Etxebarria, A., Hardwick, J. M. & Nicholls, D. G. Calpain I induces cleavage and release of apoptosis-inducing factor from isolated mitochondria. *J. Biol. Chem.* **280**, 6447–6454 (2005).
48. Yuste, V. J. *et al.* Cysteine protease inhibition prevents mitochondrial apoptosis-inducing factor (AIF) release. *Cell Death Differ.* **12**, 1445–1448 (2005).
49. Simons, K. & Toomre, D. Lipid rafts and signal transduction. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **1**, 31–39 (2000).
50. Lee, K.-H. *et al.* The role of receptor internalization in CD95 signaling. *EMBO J.* **25**, 1009–1023 (2006).
51. Chakrabandhu, K. *et al.* Palmitoylation is required for efficient Fas cell death signaling. *EMBO J.* **26**, 209–220 (2007).
52. Parlato, S. *et al.* CD95 (APO-1/Fas) linkage to the actin cytoskeleton through ezrin in human T lymphocytes: a novel regulatory mechanism of the CD95 apoptotic pathway. *EMBO J.* **19**, 5123–5134 (2000).
53. Algeciras-Schimmich, A. *et al.* Molecular ordering of the initial signaling events of CD95. *Mol. Cell. Biol.* **22**, 207–220 (2002).
54. Chakrabandhu, K. *et al.* The extracellular glycosphingolipid-binding motif of Fas defines its internalization route, mode and outcome of signals upon activation by ligand. *Cell Death Differ.* **15**, 1824–1837 (2008).
55. Irmeler, M. *et al.* Inhibition of death receptor signals by cellular FLIP. *Nature* **388**, 190–195 (1997).
56. Thome, M. & Tschopp, J. Regulation of lymphocyte proliferation and death by FLIP. *Nat. Rev. Immunol.* **1**, 50–58 (2001).
57. Shu, H. B., Halpin, D. R. & Goeddel, D. V. Casper is a FADD- and caspase-related inducer of apoptosis. *Immunity* **6**, 751–763 (1997).
58. Lanneau, D., de Thonel, A., Maurel, S., Didelot, C. & Garrido, C. Apoptosis versus cell differentiation: role of heat shock proteins HSP90, HSP70 and HSP27. *Prion* **1**, 53–60

(2007).

59. Cohen-Saidon, C., Carmi, I., Keren, A. & Razin, E. Antiapoptotic function of Bcl-2 in mast cells is dependent on its association with heat shock protein 90 β . *Blood* **107**, 1413–1420 (2006).
60. Pandey, P. *et al.* Negative regulation of cytochrome c-mediated oligomerization of Apaf-1 and activation of procaspase-9 by heat shock protein 90. *EMBO J.* **19**, 4310–4322 (2000).
61. Datta, S. R. *et al.* Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. *Cell* **91**, 231–241 (1997).
62. Cardone, M. H. *et al.* Regulation of cell death protease caspase-9 by phosphorylation. *Science* **282**, 1318–1321 (1998).
63. Ozes, O. N. *et al.* NF-kappaB activation by tumour necrosis factor requires the Akt serine-threonine kinase. *Nature* **401**, 82–85 (1999).
64. Lewis, J. *et al.* Disruption of hsp90 function results in degradation of the death domain kinase, receptor-interacting protein (RIP), and blockage of tumor necrosis factor-induced nuclear factor-kappaB activation. *J. Biol. Chem.* **275**, 10519–10526 (2000).
65. Park, H. S., Lee, J. S., Huh, S. H., Seo, J. S. & Choi, E. J. Hsp72 functions as a natural inhibitory protein of c-Jun N-terminal kinase. *EMBO J.* **20**, 446–456 (2001).
66. Stankiewicz, A. R., Lachapelle, G., Foo, C. P. Z., Radicioni, S. M. & Mosser, D. D. Hsp70 inhibits heat-induced apoptosis upstream of mitochondria by preventing Bax translocation. *J. Biol. Chem.* **280**, 38729–38739 (2005).
67. Beere, H. M. *et al.* Heat-shock protein 70 inhibits apoptosis by preventing recruitment of procaspase-9 to the Apaf-1 apoptosome. *Nat. Cell Biol.* **2**, 469–475 (2000).
68. Sakahira, H. & Nagata, S. Co-translational folding of caspase-activated DNase with Hsp70, Hsp40, and inhibitor of caspase-activated DNase. *J. Biol. Chem.* **277**, 3364–3370 (2002).
69. Guo, F. *et al.* Mechanistic role of heat shock protein 70 in Bcr-Abl-mediated resistance to apoptosis in human acute leukemia cells. *Blood* **105**, 1246–1255 (2005).
70. Ravagnan, L. *et al.* Heat-shock protein 70 antagonizes apoptosis-inducing factor. *Nat. Cell Biol.* **3**, 839–843 (2001).
71. Bruey, J. M. *et al.* Hsp27 negatively regulates cell death by interacting with

cytochrome c. *Nat. Cell Biol.* **2**, 645–652 (2000).

72. Paul, C. *et al.* Hsp27 as a negative regulator of cytochrome C release. *Mol. Cell. Biol.* **22**, 816–834 (2002).

73. Chauhan, D. *et al.* Hsp27 inhibits release of mitochondrial protein Smac in multiple myeloma cells and confers dexamethasone resistance. *Blood* **102**, 3379–3386 (2003).

74. Parcellier, A. *et al.* HSP27 is a ubiquitin-binding protein involved in I-kappaBalpha proteasomal degradation. *Mol. Cell. Biol.* **23**, 5790–5802 (2003).

75. Gyrd-Hansen, M. & Meier, P. IAPs: from caspase inhibitors to modulators of NF- κ B, inflammation and cancer. *Nat. Rev. Cancer* **10**, 561–574 (2010).

76. Deveraux, Q. L., Takahashi, R., Salvesen, G. S. & Reed, J. C. X-linked IAP is a direct inhibitor of cell-death proteases. *Nature* **388**, 300–304 (1997).

77. Roy, N., Deveraux, Q. L., Takahashi, R., Salvesen, G. S. & Reed, J. C. The c-IAP-1 and c-IAP-2 proteins are direct inhibitors of specific caspases. *EMBO J.* **16**, 6914–6925 (1997).

78. Bertrand, M. J. M. *et al.* cIAP1 and cIAP2 facilitate cancer cell survival by functioning as E3 ligases that promote RIP1 ubiquitination. *Mol. Cell* **30**, 689–700 (2008).

79. Varfolomeev, E. *et al.* IAP antagonists induce autoubiquitination of c-IAPs, NF-kappaB activation, and TNFalpha-dependent apoptosis. *Cell* **131**, 669–681 (2007).

80. Varfolomeev, E. *et al.* c-IAP1 and c-IAP2 are critical mediators of tumor necrosis factor alpha (TNFalpha)-induced NF-kappaB activation. *J. Biol. Chem.* **283**, 24295–24299 (2008).

81. Tang, G. *et al.* Inhibition of JNK activation through NF-kappaB target genes. *Nature* **414**, 313–317 (2001).

82. Wang, C. Y., Mayo, M. W., Korneluk, R. G., Goeddel, D. V. & Baldwin, A. S., Jr. NF-kappaB antiapoptosis: induction of TRAF1 and TRAF2 and c-IAP1 and c-IAP2 to suppress caspase-8 activation. *Science* **281**, 1680–1683 (1998).

83. Liston, P. *et al.* Suppression of apoptosis in mammalian cells by NAIP and a related family of IAP genes. *Nature* **379**, 349–353 (1996).

84. Chai, J. *et al.* Structural and biochemical basis of apoptotic activation by Smac/DIABLO. *Nature* **406**, 855–862 (2000).

85. Verhagen, A. M. *et al.* HtrA2 promotes cell death through its serine protease

activity and its ability to antagonize inhibitor of apoptosis proteins. *J. Biol. Chem.* **277**, 445–454 (2002).

86. Wang, D. *et al.* A requirement for CARMA1 in TCR-induced NF-kappa B activation. *Nat. Immunol.* **3**, 830–835 (2002).

87. Wang, D. *et al.* CD3/CD28 costimulation-induced NF-kappaB activation is mediated by recruitment of protein kinase C-theta, Bcl10, and IkappaB kinase beta to the immunological synapse through CARMA1. *Mol. Cell. Biol.* **24**, 164–171 (2004).

88. Qiao, Q. *et al.* Structural architecture of the CARMA1/Bcl10/MALT1 signalosome: nucleation-induced filamentous assembly. *Mol. Cell* **51**, 766–779 (2013).

89. Li, Y., He, X., Wang, S., Shu, H.-B. & Liu, Y. USP2a positively regulates TCR-induced NF-κB activation by bridging MALT1-TRAF6. *Protein Cell* **4**, 62–70 (2013).

90. Kobayashi, T. *et al.* TRAF6 is required for generation of the B-1a B cell compartment as well as T cell-dependent and -independent humoral immune responses. *PloS One* **4**, e4736 (2009).

91. Gerondakis, S., Fulford, T. S., Messina, N. L. & Grumont, R. J. NF-κB control of T cell development. *Nat. Immunol.* **15**, 15–25 (2013).

92. Frantz, B. *et al.* Calcineurin acts in synergy with PMA to inactivate I kappa B/MAD3, an inhibitor of NF-kappa B. *EMBO J.* **13**, 861–870 (1994).

93. Bertrand, M. J. M. *et al.* cIAP1 and cIAP2 facilitate cancer cell survival by functioning as E3 ligases that promote RIP1 ubiquitination. *Mol. Cell* **30**, 689–700 (2008).

94. Kataoka, T. & Tschopp, J. N-terminal fragment of c-FLIP(L) processed by caspase 8 specifically interacts with TRAF2 and induces activation of the NF-kappaB signaling pathway. *Mol. Cell. Biol.* **24**, 2627–2636 (2004).

95. Golks, A., Brenner, D., Krammer, P. H. & Lavrik, I. N. The c-FLIP-NH2 terminus (p22-FLIP) induces NF-kappaB activation. *J. Exp. Med.* **203**, 1295–1305 (2006).

96. Zheng, Y., Vig, M., Lyons, J., Van Parijs, L. & Beg, A. A. Combined deficiency of p50 and cRel in CD4⁺ T cells reveals an essential requirement for nuclear factor kappaB in regulating mature T cell survival and in vivo function. *J. Exp. Med.* **197**, 861–874 (2003).

97. Bertolotto, C., Maulon, L., Filippa, N., Baier, G. & Auburger, P. Protein kinase C theta and epsilon promote T-cell survival by a rsk-dependent phosphorylation and inactivation of BAD. *J. Biol. Chem.* **275**, 37246–37250 (2000).

98. Villalba, M., Bushway, P. & Altman, A. Protein kinase C-theta mediates a selective

T cell survival signal via phosphorylation of BAD. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **166**, 5955–5963 (2001).

99. Ryseck, R. P. & Bravo, R. c-JUN, JUN B, and JUN D differ in their binding affinities to AP-1 and CRE consensus sequences: effect of FOS proteins. *Oncogene* **6**, 533–542 (1991).

100. Schütte, J. *et al.* jun-B inhibits and c-fos stimulates the transforming and trans-activating activities of c-jun. *Cell* **59**, 987–997 (1989).

101. Cavigelli, M., Dolfi, F., Claret, F. X. & Karin, M. Induction of c-fos expression through JNK-mediated TCF/Elk-1 phosphorylation. *EMBO J.* **14**, 5957–5964 (1995).

102. Devary, Y., Gottlieb, R. A., Lau, L. F. & Karin, M. Rapid and preferential activation of the c-jun gene during the mammalian UV response. *Mol. Cell. Biol.* **11**, 2804–2811 (1991).

103. Wan, Y. Y., Chi, H., Xie, M., Schneider, M. D. & Flavell, R. A. The kinase TAK1 integrates antigen and cytokine receptor signaling for T cell development, survival and function. *Nat. Immunol.* **7**, 851–858 (2006).

104. Colotta, F., Polentarutti, N., Sironi, M. & Mantovani, A. Expression and involvement of c-fos and c-jun protooncogenes in programmed cell death induced by growth factor deprivation in lymphoid cell lines. *J. Biol. Chem.* **267**, 18278–18283 (1992).

105. Shaulian, E. & Karin, M. AP-1 in cell proliferation and survival. *Oncogene* **20**, 2390–2400 (2001).

106. Liu, J. & Lin, A. Role of JNK activation in apoptosis: a double-edged sword. *Cell Res.* **15**, 36–42 (2005).

107. Burgering, B. M. & Coffey, P. J. Protein kinase B (c-Akt) in phosphatidylinositol-3-OH kinase signal transduction. *Nature* **376**, 599–602 (1995).

108. Matsuzaki, H., Daitoku, H., Hatta, M., Tanaka, K. & Fukamizu, A. Insulin-induced phosphorylation of FKHR (Foxo1) targets to proteasomal degradation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100**, 11285–11290 (2003).

109. Modur, V., Nagarajan, R., Evers, B. M. & Milbrandt, J. FOXO proteins regulate tumor necrosis factor-related apoptosis inducing ligand expression. Implications for PTEN mutation in prostate cancer. *J. Biol. Chem.* **277**, 47928–47937 (2002).

110. Brunet, A. *et al.* Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor. *Cell* **96**, 857–868 (1999).

111. Dijkers, P. F., Medema, R. H., Lammers, J. W., Koenderman, L. & Coffey, P. J. Expression of the pro-apoptotic Bcl-2 family member Bim is regulated by the forkhead transcription factor FKHR-L1. *Curr. Biol. CB* **10**, 1201–1204 (2000).
112. Stahl, M. *et al.* The forkhead transcription factor FoxO regulates transcription of p27Kip1 and Bim in response to IL-2. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **168**, 5024–5031 (2002).
113. You, H. *et al.* FOXO3a-dependent regulation of Puma in response to cytokine/growth factor withdrawal. *J. Exp. Med.* **203**, 1657–1663 (2006).
114. Villunger, A. *et al.* p53- and drug-induced apoptotic responses mediated by BH3-only proteins puma and noxa. *Science* **302**, 1036–1038 (2003).
115. Jeffers, J. R. *et al.* Puma is an essential mediator of p53-dependent and -independent apoptotic pathways. *Cancer Cell* **4**, 321–328 (2003).
116. Shibue, T. *et al.* Integral role of Noxa in p53-mediated apoptotic response. *Genes Dev.* **17**, 2233–2238 (2003).
117. Knudson, C. M., Tung, K. S., Tourtellotte, W. G., Brown, G. A. & Korsmeyer, S. J. Bax-deficient mice with lymphoid hyperplasia and male germ cell death. *Science* **270**, 96–99 (1995).
118. Sax, J. K. *et al.* BID regulation by p53 contributes to chemosensitivity. *Nat. Cell Biol.* **4**, 842–849 (2002).
119. Bennett, M. *et al.* Cell surface trafficking of Fas: a rapid mechanism of p53-mediated apoptosis. *Science* **282**, 290–293 (1998).
120. Burns, T. F., Bernhard, E. J. & El-Deiry, W. S. Tissue specific expression of p53 target genes suggests a key role for KILLER/DR5 in p53-dependent apoptosis in vivo. *Oncogene* **20**, 4601–4612 (2001).
121. Soengas, M. S. *et al.* Apaf-1 and caspase-9 in p53-dependent apoptosis and tumor inhibition. *Science* **284**, 156–159 (1999).
122. Hueber, A. O., Zörnig, M., Bernard, A. M., Chautan, M. & Evan, G. A dominant negative Fas-associated death domain protein mutant inhibits proliferation and leads to impaired calcium mobilization in both T-cells and fibroblasts. *J. Biol. Chem.* **275**, 10453–10462 (2000).
123. Isakov, N. ITIMs and ITAMs. The Yin and Yang of antigen and Fc receptor-linked signaling machinery. *Immunol. Res.* **16**, 85–100 (1997).
124. Tsuchida, M., Manthei, E. R., Knechtle, S. J. & Hamawy, M. M. CD28 ligation induces

rapid tyrosine phosphorylation of the linker molecule LAT in the absence of Syk and ZAP-70 tyrosine phosphorylation. *Eur. J. Immunol.* **29**, 2354–2359 (1999).

125. Jiang, Y. & Cheng, H. Evidence of LAT as a dual substrate for Lck and Syk in T lymphocytes. *Leuk. Res.* **31**, 541–545 (2007).

126. Ku, Y. *et al.* A new possible regulatory system for protein phosphorylation in human peripheral lymphocytes. II. Possible relation to phosphatidylinositol turnover induced by mitogens. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **127**, 1375–1379 (1981).

127. Ebinu, J. O. *et al.* RasGRP links T-cell receptor signaling to Ras. *Blood* **95**, 3199–3203 (2000).

128. Clipstone, N. A. & Crabtree, G. R. Identification of calcineurin as a key signalling enzyme in T-lymphocyte activation. *Nature* **357**, 695–697 (1992).

129. Frantz, B. *et al.* Calcineurin acts in synergy with PMA to inactivate I kappa B/MAD3, an inhibitor of NF-kappa B. *EMBO J.* **13**, 861–870 (1994).

130. Brownlie, R. J. & Zamoyska, R. T cell receptor signalling networks: branched, diversified and bounded. *Nat. Rev. Immunol.* **13**, 257–269 (2013).

131. Boise, L. H. *et al.* CD28 costimulation can promote T cell survival by enhancing the expression of Bcl-XL. *Immunity* **3**, 87–98 (1995).

132. Brenner, D., Krammer, P. H. & Arnold, R. Concepts of activated T cell death. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* **66**, 52–64 (2008).

133. Lenardo, M. *et al.* Mature T lymphocyte apoptosis--immune regulation in a dynamic and unpredictable antigenic environment. *Annu. Rev. Immunol.* **17**, 221–253 (1999).

134. Fisher, G. H. *et al.* Dominant interfering Fas gene mutations impair apoptosis in a human autoimmune lymphoproliferative syndrome. *Cell* **81**, 935–946 (1995).

135. Zheng, L. *et al.* Induction of apoptosis in mature T cells by tumour necrosis factor. *Nature* **377**, 348–351 (1995).

136. Mateo, V. *et al.* Perforin-dependent apoptosis functionally compensates Fas deficiency in activation-induced cell death of human T lymphocytes. *Blood* **110**, 4285–4292 (2007).

137. Snow, A. L. *et al.* Critical role for BIM in T cell receptor restimulation-induced death. *Biol. Direct* **3**, 34 (2008).

138. Janssen, E. M. *et al.* CD4+ T-cell help controls CD8+ T-cell memory via TRAIL-mediated activation-induced cell death. *Nature* **434**, 88–93 (2005).

139. Refaeli, Y., Van Parijs, L., London, C. A., Tschopp, J. & Abbas, A. K. Biochemical mechanisms of IL-2-regulated Fas-mediated T cell apoptosis. *Immunity* **8**, 615–623 (1998).
140. Brenner, D., Golks, A., Kiefer, F., Krammer, P. H. & Arnold, R. Activation or suppression of NFkappaB by HPK1 determines sensitivity to activation-induced cell death. *EMBO J.* **24**, 4279–4290 (2005).
141. Kasibhatla, S., Genestier, L. & Green, D. R. Regulation of fas-ligand expression during activation-induced cell death in T lymphocytes via nuclear factor kappaB. *J. Biol. Chem.* **274**, 987–992 (1999).
142. Hildeman, D. A., Zhu, Y., Mitchell, T. C., Kappler, J. & Marrack, P. Molecular mechanisms of activated T cell death in vivo. *Curr. Opin. Immunol.* **14**, 354–359 (2002).
143. Hildeman, D. A. *et al.* Activated T cell death in vivo mediated by proapoptotic bcl-2 family member bim. *Immunity* **16**, 759–767 (2002).
144. Hildeman, D. A. *et al.* Control of Bcl-2 expression by reactive oxygen species. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100**, 15035–15040 (2003).
145. Oliveira, J. B. *et al.* NRAS mutation causes a human autoimmune lymphoproliferative syndrome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104**, 8953–8958 (2007).
146. Straus, S. E. The development of lymphomas in families with autoimmune lymphoproliferative syndrome with germline Fas mutations and defective lymphocyte apoptosis. *Blood* **98**, 194–200 (2001).
147. Magerus-Chatinet, A. *et al.* FAS-L, IL-10, and double-negative CD4- CD8- TCR alpha/beta+ T cells are reliable markers of autoimmune lymphoproliferative syndrome (ALPS) associated with FAS loss of function. *Blood* **113**, 3027–3030 (2009).
148. Bleesing, J. J. H. *et al.* A composite picture of TcR alpha/beta(+) CD4(-)CD8(-) T Cells (alpha/beta-DNTCs) in humans with autoimmune lymphoproliferative syndrome. *Clin. Immunol. Orlando Fla* **104**, 21–30 (2002).
149. Crispín, J. C. & Tsokos, G. C. Human TCR-alpha beta+ CD4- CD8- T cells can derive from CD8+ T cells and display an inflammatory effector phenotype. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **183**, 4675–4681 (2009).
150. Rensing-Ehl, A. *et al.* Abnormally differentiated CD4+ or CD8+ T-cells with phenotypic and genetic features of double negative T-cells in human Fas deficiency. *Blood* (2014). doi:10.1182/blood-2014-03-564286
151. Holzelova, E. *et al.* Autoimmune lymphoproliferative syndrome with somatic Fas

mutations. *N. Engl. J. Med.* **351**, 1409–1418 (2004).

152. Magerus-Chatinet, A. *et al.* Onset of autoimmune lymphoproliferative syndrome (ALPS) in humans as a consequence of genetic defect accumulation. *J. Clin. Invest.* **121**, 106–112 (2011).

153. Del-Rey, M. *et al.* A homozygous Fas ligand gene mutation in a patient causes a new type of autoimmune lymphoproliferative syndrome. *Blood* **108**, 1306–1312 (2006).

154. Bi, L. L. *et al.* Dominant inhibition of Fas ligand-mediated apoptosis due to a heterozygous mutation associated with autoimmune lymphoproliferative syndrome (ALPS) Type Ib. *BMC Med. Genet.* **8**, 41 (2007).

155. Magerus-Chatinet, A. *et al.* Autoimmune lymphoproliferative syndrome caused by a homozygous null FAS ligand (FASLG) mutation. *J. Allergy Clin. Immunol.* **131**, 486–490 (2013).

156. Wang, J. *et al.* Inherited human Caspase 10 mutations underlie defective lymphocyte and dendritic cell apoptosis in autoimmune lymphoproliferative syndrome type II. *Cell* **98**, 47–58 (1999).

157. Chun, H. J. *et al.* Pleiotropic defects in lymphocyte activation caused by caspase-8 mutations lead to human immunodeficiency. *Nature* **419**, 395–399 (2002).

158. Bolze, A. *et al.* Whole-exome-sequencing-based discovery of human FADD deficiency. *Am. J. Hum. Genet.* **87**, 873–881 (2010).

159. Takagi, M. *et al.* Autoimmune lymphoproliferative syndrome-like disease with somatic KRAS mutation. *Blood* **117**, 2887–2890 (2011).

160. Niemela, J. E. *et al.* Somatic KRAS mutations associated with a human nonmalignant syndrome of autoimmunity and abnormal leukocyte homeostasis. *Blood* **117**, 2883–2886 (2011).

161. Takagi, M. *et al.* Autoimmunity and persistent RAS-mutated clones long after the spontaneous regression of JMML. *Leukemia* **27**, 1926–1928 (2013).

162. HARVEY, J. J. AN UNIDENTIFIED VIRUS WHICH CAUSES THE RAPID PRODUCTION OF TUMOURS IN MICE. *Nature* **204**, 1104–1105 (1964).

163. Kirsten, W. H. & Mayer, L. A. Morphologic responses to a murine erythroblastosis virus. *J. Natl. Cancer Inst.* **39**, 311–335 (1967).

164. Peters, R. L., Rabstein, L. S., VanVleck, R., Kelloff, G. J. & Huebner, R. J. Naturally occurring sarcoma virus of the BALB/cCr mouse. *J. Natl. Cancer Inst.* **53**, 1725–1729 (1974).

165. Rasheed, S., Gardner, M. B. & Huebner, R. J. In vitro isolation of stable rat sarcoma viruses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **75**, 2972–2976 (1978).
166. Scolnick, E. M., Rands, E., Williams, D. & Parks, W. P. Studies on the nucleic acid sequences of Kirsten sarcoma virus: a model for formation of a mammalian RNA-containing sarcoma virus. *J. Virol.* **12**, 458–463 (1973).
167. Ellis, R. W. *et al.* The p21 src genes of Harvey and Kirsten sarcoma viruses originate from divergent members of a family of normal vertebrate genes. *Nature* **292**, 506–511 (1981).
168. Shimizu, K., Goldfarb, M., Perucho, M. & Wigler, M. Isolation and preliminary characterization of the transforming gene of a human neuroblastoma cell line. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **80**, 383–387 (1983).
169. Hall, A., Marshall, C. J., Spurr, N. K. & Weiss, R. A. Identification of transforming gene in two human sarcoma cell lines as a new member of the ras gene family located on chromosome 1. *Nature* **303**, 396–400 (1983).
170. Maher, J., Baker, D. A., Manning, M., Dibb, N. J. & Roberts, I. A. Evidence for cell-specific differences in transformation by N-, H- and K-ras. *Oncogene* **11**, 1639–1647 (1995).
171. Parada, L. F., Tabin, C. J., Shih, C. & Weinberg, R. A. Human EJ bladder carcinoma oncogene is homologue of Harvey sarcoma virus ras gene. *Nature* **297**, 474–478 (1982).
172. Santos, E., Tronick, S. R., Aaronson, S. A., Pulciani, S. & Barbacid, M. T24 human bladder carcinoma oncogene is an activated form of the normal human homologue of BALB- and Harvey-MSV transforming genes. *Nature* **298**, 343–347 (1982).
173. Reddy, E. P., Reynolds, R. K., Santos, E. & Barbacid, M. A point mutation is responsible for the acquisition of transforming properties by the T24 human bladder carcinoma oncogene. *Nature* **300**, 149–152 (1982).
174. Tabin, C. J. *et al.* Mechanism of activation of a human oncogene. *Nature* **300**, 143–149 (1982).
175. Taparowsky, E. *et al.* Activation of the T24 bladder carcinoma transforming gene is linked to a single amino acid change. *Nature* **300**, 762–765 (1982).
176. Santos, E. *et al.* Malignant activation of a K-ras oncogene in lung carcinoma but not in normal tissue of the same patient. *Science* **223**, 661–664 (1984).
177. Bos, J. L. *et al.* Prevalence of ras gene mutations in human colorectal cancers. *Nature* **327**, 293–297 (1987).

178. Forrester, K., Almoguera, C., Han, K., Grizzle, W. E. & Perucho, M. Detection of high incidence of K-ras oncogenes during human colon tumorigenesis. *Nature* **327**, 298–303 (1987).
179. Rodenhuis, S. *et al.* Mutational activation of the K-ras oncogene. A possible pathogenetic factor in adenocarcinoma of the lung. *N. Engl. J. Med.* **317**, 929–935 (1987).
180. Almoguera, C. *et al.* Most human carcinomas of the exocrine pancreas contain mutant c-K-ras genes. *Cell* **53**, 549–554 (1988).
181. Land, H., Parada, L. F. & Weinberg, R. A. Tumorigenic conversion of primary embryo fibroblasts requires at least two cooperating oncogenes. *Nature* **304**, 596–602 (1983).
182. Ruley, H. E. Adenovirus early region 1A enables viral and cellular transforming genes to transform primary cells in culture. *Nature* **304**, 602–606 (1983).
183. Kamata, T. & Feramisco, J. R. Epidermal growth factor stimulates guanine nucleotide binding activity and phosphorylation of ras oncogene proteins. *Nature* **310**, 147–150 (1984).
184. Schubbert, S., Shannon, K. & Bollag, G. Hyperactive Ras in developmental disorders and cancer. *Nat. Rev. Cancer* **7**, 295–308 (2007).
185. Yoon, C. H., Lee, J., Jongeward, G. D. & Sternberg, P. W. Similarity of sli-1, a regulator of vulval development in *C. elegans*, to the mammalian proto-oncogene c-cbl. *Science* **269**, 1102–1105 (1995).
186. Gross, I., Bassit, B., Benezra, M. & Licht, J. D. Mammalian sprouty proteins inhibit cell growth and differentiation by preventing ras activation. *J. Biol. Chem.* **276**, 46460–46468 (2001).
187. Yusoff, P. *et al.* Sprouty2 inhibits the Ras/MAP kinase pathway by inhibiting the activation of Raf. *J. Biol. Chem.* **277**, 3195–3201 (2002).
188. Manser, E., Leung, T., Salihuddin, H., Tan, L. & Lim, L. A non-receptor tyrosine kinase that inhibits the GTPase activity of p21cdc42. *Nature* **363**, 364–367 (1993).
189. Levkowitz, G. *et al.* c-Cbl/Sli-1 regulates endocytic sorting and ubiquitination of the epidermal growth factor receptor. *Genes Dev.* **12**, 3663–3674 (1998).
190. Zhang, W., Tribble, R. P. & Samelson, L. E. LAT palmitoylation: its essential role in membrane microdomain targeting and tyrosine phosphorylation during T cell activation. *Immunity* **9**, 239–246 (1998).
191. Finco, T. S., Kadlecsek, T., Zhang, W., Samelson, L. E. & Weiss, A. LAT is required for

TCR-mediated activation of PLCgamma1 and the Ras pathway. *Immunity* **9**, 617–626 (1998).

192. Liu, S. K., Fang, N., Koretzky, G. A. & McGlade, C. J. The hematopoietic-specific adaptor protein gads functions in T-cell signaling via interactions with the SLP-76 and LAT adaptors. *Curr. Biol. CB* **9**, 67–75 (1999).

193. Yablonski, D., Kuhne, M. R., Kadlecsek, T. & Weiss, A. Uncoupling of nonreceptor tyrosine kinases from PLC-gamma1 in an SLP-76-deficient T cell. *Science* **281**, 413–416 (1998).

194. Izquierdo, M., Downward, J., Graves, J. D. & Cantrell, D. A. Role of protein kinase C in T-cell antigen receptor regulation of p21ras: evidence that two p21ras regulatory pathways coexist in T cells. *Mol. Cell. Biol.* **12**, 3305–3312 (1992).

195. Alberola-Ila, J., Forbush, K. A., Seger, R., Krebs, E. G. & Perlmutter, R. M. Selective requirement for MAP kinase activation in thymocyte differentiation. *Nature* **373**, 620–623 (1995).

196. Marklund, U., Brattsand, G., Shingler, V. & Gullberg, M. Serine 25 of oncoprotein 18 is a major cytosolic target for the mitogen-activated protein kinase. *J. Biol. Chem.* **268**, 15039–15047 (1993).

197. Genot, E., Cleverley, S., Henning, S. & Cantrell, D. Multiple p21ras effector pathways regulate nuclear factor of activated T cells. *EMBO J.* **15**, 3923–3933 (1996).

198. Ng, J. & Cantrell, D. STAT3 is a serine kinase target in T lymphocytes. Interleukin 2 and T cell antigen receptor signals converge upon serine 727. *J. Biol. Chem.* **272**, 24542–24549 (1997).

199. Boussiotis, V. A., Freeman, G. J., Berezovskaya, A., Barber, D. L. & Nadler, L. M. Maintenance of human T cell anergy: blocking of IL-2 gene transcription by activated Rap1. *Science* **278**, 124–128 (1997).

200. Genot, E. & Cantrell, D. A. Ras regulation and function in lymphocytes. *Curr. Opin. Immunol.* **12**, 289–294 (2000).

201. Genot, E., Reif, K., Beach, S., Kramer, I. & Cantrell, D. p21ras initiates Rac-1 but not phosphatidylinositol 3 kinase/PKB, mediated signaling pathways in T lymphocytes. *Oncogene* **17**, 1731–1738 (1998).

202. Reif, K., Lucas, S. & Cantrell, D. A negative role for phosphoinositide 3-kinase in T-cell antigen receptor function. *Curr. Biol. CB* **7**, 285–293 (1997).

203. Rodriguez-Viciana, P. *et al.* Phosphatidylinositol-3-OH kinase as a direct target of

Ras. *Nature* **370**, 527–532 (1994).

204. Kauffmann-Zeh, A. *et al.* Suppression of c-Myc-induced apoptosis by Ras signalling through PI(3)K and PKB. *Nature* **385**, 544–548 (1997).

205. Burgering, B. M. T. & Coffey, P. J. Protein kinase B (c-Akt) in phosphatidylinositol-3-OH kinase signal transduction. *Nature* **376**, 599–602 (1995).

206. Blume-Jensen, P., Janknecht, R. & Hunter, T. The kit receptor promotes cell survival via activation of PI 3-kinase and subsequent Akt-mediated phosphorylation of Bad on Ser136. *Curr. Biol. CB* **8**, 779–782 (1998).

207. Del Peso, L., González-García, M., Page, C., Herrera, R. & Nuñez, G. Interleukin-3-induced phosphorylation of BAD through the protein kinase Akt. *Science* **278**, 687–689 (1997).

208. Wang, H. G. *et al.* Ca²⁺-induced apoptosis through calcineurin dephosphorylation of BAD. *Science* **284**, 339–343 (1999).

209. Andjelković, M. *et al.* Role of translocation in the activation and function of protein kinase B. *J. Biol. Chem.* **272**, 31515–31524 (1997).

210. Meier, R., Alessi, D. R., Cron, P., Andjelković, M. & Hemmings, B. A. Mitogenic activation, phosphorylation, and nuclear translocation of protein kinase B β . *J. Biol. Chem.* **272**, 30491–30497 (1997).

211. Tang, E. D., Nuñez, G., Barr, F. G. & Guan, K. L. Negative regulation of the forkhead transcription factor FKHR by Akt. *J. Biol. Chem.* **274**, 16741–16746 (1999).

212. Brunet, A. *et al.* Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor. *Cell* **96**, 857–868 (1999).

213. Rosen, K. *et al.* Downregulation of the pro-apoptotic protein Bak is required for the ras-induced transformation of intestinal epithelial cells. *Curr. Biol. CB* **8**, 1331–1334 (1998).

214. Rosen, K. *et al.* Activated Ras prevents downregulation of Bcl-X(L) triggered by detachment from the extracellular matrix. A mechanism of Ras-induced resistance to anoikis in intestinal epithelial cells. *J. Cell Biol.* **149**, 447–456 (2000).

215. Cox, A. D. & Der, C. J. The dark side of Ras: regulation of apoptosis. *Oncogene* **22**, 8999–9006 (2003).

216. Kazama, H. & Yonehara, S. Oncogenic K-Ras and basic fibroblast growth factor prevent Fas-mediated apoptosis in fibroblasts through activation of mitogen-activated protein kinase. *J. Cell Biol.* **148**, 557–566 (2000).

217. Wang, W., Prince, C. Z., Mou, Y. & Pollman, M. J. Notch3 signaling in vascular smooth muscle cells induces c-FLIP expression via ERK/MAPK activation. Resistance to Fas ligand-induced apoptosis. *J. Biol. Chem.* **277**, 21723–21729 (2002).
218. Yeh, J. H., Hsu, S. C., Han, S. H. & Lai, M. Z. Mitogen-activated protein kinase kinase antagonized fas-associated death domain protein-mediated apoptosis by induced FLICE-inhibitory protein expression. *J. Exp. Med.* **188**, 1795–1802 (1998).
219. Tran, S. E., Holmstrom, T. H., Ahonen, M., Kahari, V. M. & Eriksson, J. E. MAPK/ERK overrides the apoptotic signaling from Fas, TNF, and TRAIL receptors. *J. Biol. Chem.* **276**, 16484–16490 (2001).
220. Holmström, T. H. *et al.* Inhibition of mitogen-activated kinase signaling sensitizes HeLa cells to Fas receptor-mediated apoptosis. *Mol. Cell. Biol.* **19**, 5991–6002 (1999).
221. Söderström, T. S., Poukkula, M., Holmström, T. H., Heiskanen, K. M. & Eriksson, J. E. Mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase signaling in activated T cells abrogates TRAIL-induced apoptosis upstream of the mitochondrial amplification loop and caspase-8. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **169**, 2851–2860 (2002).
222. Holmström, T. H. *et al.* Suppression of Fas/APO-1-mediated apoptosis by mitogen-activated kinase signaling. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **160**, 2626–2636 (1998).
223. Kotone-Miyahara, Y. *et al.* Short-term delay of Fas-stimulated apoptosis by GM-CSF as a result of temporary suppression of FADD recruitment in neutrophils: evidence implicating phosphatidylinositol 3-kinase and MEK1-ERK1/2 pathways downstream of classical protein kinase C. *J. Leukoc. Biol.* **76**, 1047–1056 (2004).
224. Meng, X. W. *et al.* Central role of Fas-associated death domain protein in apoptosis induction by the mitogen-activated protein kinase kinase inhibitor CI-1040 (PD184352) in acute lymphocytic leukemia cells in vitro. *J. Biol. Chem.* **278**, 47326–47339 (2003).
225. Marani, M. *et al.* Role of Bim in the survival pathway induced by Raf in epithelial cells. *Oncogene* **23**, 2431–2441 (2004).
226. Luciano, F. *et al.* Phosphorylation of Bim-EL by Erk1/2 on serine 69 promotes its degradation via the proteasome pathway and regulates its proapoptotic function. *Oncogene* **22**, 6785–6793 (2003).
227. Sarker, M., Ruiz-Ruiz, C., Robledo, G. & López-Rivas, A. Stimulation of the mitogen-activated protein kinase pathway antagonizes TRAIL-induced apoptosis downstream of

BID cleavage in human breast cancer MCF-7 cells. *Oncogene* **21**, 4323–4327 (2002).

228. Zhang, X. D., Borrow, J. M., Zhang, X. Y., Nguyen, T. & Hersey, P. Activation of ERK1/2 protects melanoma cells from TRAIL-induced apoptosis by inhibiting Smac/DIABLO release from mitochondria. *Oncogene* **22**, 2869–2881 (2003).

229. Bonni, A. *et al.* Cell survival promoted by the Ras-MAPK signaling pathway by transcription-dependent and -independent mechanisms. *Science* **286**, 1358–1362 (1999).

230. She, Q.-B., Ma, W.-Y., Zhong, S. & Dong, Z. Activation of JNK1, RSK2, and MSK1 is involved in serine 112 phosphorylation of Bad by ultraviolet B radiation. *J. Biol. Chem.* **277**, 24039–24048 (2002).

231. Schubert, K. M. & Duronio, V. Distinct roles for extracellular-signal-regulated protein kinase (ERK) mitogen-activated protein kinases and phosphatidylinositol 3-kinase in the regulation of Mcl-1 synthesis. *Biochem. J.* **356**, 473–480 (2001).

232. Schulze, A., Lehmann, K., Jefferies, H. B., McMahon, M. & Downward, J. Analysis of the transcriptional program induced by Raf in epithelial cells. *Genes Dev.* **15**, 981–994 (2001).

233. Dimmeler, S., Breitschopf, K., Haendeler, J. & Zeiher, A. M. Dephosphorylation targets Bcl-2 for ubiquitin-dependent degradation: a link between the apoptosome and the proteasome pathway. *J. Exp. Med.* **189**, 1815–1822 (1999).

234. Breitschopf, K., Haendeler, J., Malchow, P., Zeiher, A. M. & Dimmeler, S. Posttranslational modification of Bcl-2 facilitates its proteasome-dependent degradation: molecular characterization of the involved signaling pathway. *Mol. Cell. Biol.* **20**, 1886–1896 (2000).

235. Gardai, S. J., Whitlock, B. B., Xiao, Y. Q., Bratton, D. B. & Henson, P. M. Oxidants inhibit ERK/MAPK and prevent its ability to delay neutrophil apoptosis downstream of mitochondrial changes and at the level of XIAP. *J. Biol. Chem.* **279**, 44695–44703 (2004).

236. Lin, H., Chen, C., Li, X. & Chen, B. D. Activation of the MEK/MAPK pathway is involved in bryostatin1-induced monocytic differentiation and up-regulation of X-linked inhibitor of apoptosis protein. *Exp. Cell Res.* **272**, 192–198 (2002).

237. Milella, M. *et al.* Therapeutic targeting of the MEK/MAPK signal transduction module in acute myeloid leukemia. *J. Clin. Invest.* **108**, 851–859 (2001).

238. Pardo, O. E. *et al.* Fibroblast growth factor 2-mediated translational control of IAPs blocks mitochondrial release of Smac/DIABLO and apoptosis in small cell lung

cancer cells. *Mol. Cell. Biol.* **23**, 7600–7610 (2003).

239. Tewari, R., Sharma, V., Koul, N. & Sen, E. Involvement of miltefosine-mediated ERK activation in glioma cell apoptosis through Fas regulation. *J. Neurochem.* **107**, 616–627 (2008).

240. Tanaka, Y. *et al.* H-Ras/mitogen-activated protein kinase pathway inhibits integrin-mediated adhesion and induces apoptosis in osteoblasts. *J. Biol. Chem.* **277**, 21446–21452 (2002).

241. Cagnol, S., Van Obberghen-Schilling, E. & Chambard, J.-C. Prolonged activation of ERK1,2 induces FADD-independent caspase 8 activation and cell death. *Apoptosis Int. J. Program. Cell Death* **11**, 337–346 (2006).

242. Drosopoulos, K. G. *et al.* Transformation by oncogenic RAS sensitizes human colon cells to TRAIL-induced apoptosis by up-regulating death receptor 4 and death receptor 5 through a MEK-dependent pathway. *J. Biol. Chem.* **280**, 22856–22867 (2005).

243. Shenoy, K., Wu, Y. & Pervaiz, S. LY303511 enhances TRAIL sensitivity of SHEP-1 neuroblastoma cells via hydrogen peroxide-mediated mitogen-activated protein kinase activation and up-regulation of death receptors. *Cancer Res.* **69**, 1941–1950 (2009).

244. Li, H. *et al.* hPEBP4 resists TRAIL-induced apoptosis of human prostate cancer cells by activating Akt and deactivating ERK1/2 pathways. *J. Biol. Chem.* **282**, 4943–4950 (2007).

245. Panaretakis, T. *et al.* Interferon alpha induces nucleus-independent apoptosis by activating extracellular signal-regulated kinase 1/2 and c-Jun NH₂-terminal kinase downstream of phosphatidylinositol 3-kinase and mammalian target of rapamycin. *Mol. Biol. Cell* **19**, 41–50 (2008).

246. Gomez-Sarosi, L. A., Strasberg-Rieber, M. & Rieber, M. ERK activation increases nitroprusside induced apoptosis in human melanoma cells irrespective of p53 status: role of superoxide dismutases. *Cancer Biol. Ther.* **8**, 1173–1182 (2009).

247. Park, B. G., Yoo, C. I., Kim, H. T., Kwon, C. H. & Kim, Y. K. Role of mitogen-activated protein kinases in hydrogen peroxide-induced cell death in osteoblastic cells. *Toxicology* **215**, 115–125 (2005).

248. Wu, Z., Wu, L., Tashiro, S., Onodera, S. & Ikejima, T. Phosphorylated extracellular signal-regulated kinase up-regulated p53 expression in shikonin-induced HeLa cell apoptosis. *Chin. Med. J. (Engl.)* **118**, 671–677 (2005).

249. Tang, D. *et al.* ERK activation mediates cell cycle arrest and apoptosis after DNA

- damage independently of p53. *J. Biol. Chem.* **277**, 12710–12717 (2002).
250. Yeh, P. Y. *et al.* Phosphorylation of p53 on Thr55 by ERK2 is necessary for doxorubicin-induced p53 activation and cell death. *Oncogene* **23**, 3580–3588 (2004).
251. Bacus, S. S. *et al.* Taxol-induced apoptosis depends on MAP kinase pathways (ERK and p38) and is independent of p53. *Oncogene* **20**, 147–155 (2001).
252. Ries, S. *et al.* Opposing effects of Ras on p53: transcriptional activation of mdm2 and induction of p19ARF. *Cell* **103**, 321–330 (2000).
253. Bates, S. *et al.* p14ARF links the tumour suppressors RB and p53. *Nature* **395**, 124–125 (1998).
254. Tao, W. & Levine, A. J. P19(ARF) stabilizes p53 by blocking nucleo-cytoplasmic shuttling of Mdm2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **96**, 6937–6941 (1999).
255. Bollag, G. & McCormick, F. Differential regulation of rasGAP and neurofibromatosis gene product activities. *Nature* **351**, 576–579 (1991).
256. Scheffzek, K. *et al.* The Ras-RasGAP complex: structural basis for GTPase activation and its loss in oncogenic Ras mutants. *Science* **277**, 333–338 (1997).
257. Krenzel, U. *et al.* Three-dimensional structures of H-ras p21 mutants: molecular basis for their inability to function as signal switch molecules. *Cell* **62**, 539–548 (1990).
258. Estep, A. L., Tidyman, W. E., Teitell, M. A., Cotter, P. D. & Rauen, K. A. HRAS mutations in Costello syndrome: detection of constitutional activating mutations in codon 12 and 13 and loss of wild-type allele in malignancy. *Am. J. Med. Genet. A.* **140**, 8–16 (2006).
259. Gripp, K. W. *et al.* HRAS mutation analysis in Costello syndrome: genotype and phenotype correlation. *Am. J. Med. Genet. A.* **140**, 1–7 (2006).
260. Kerr, B. *et al.* Genotype-phenotype correlation in Costello syndrome: HRAS mutation analysis in 43 cases. *J. Med. Genet.* **43**, 401–405 (2006).
261. Zampino, G. *et al.* Diversity, parental germline origin, and phenotypic spectrum of de novo HRAS missense changes in Costello syndrome. *Hum. Mutat.* **28**, 265–272 (2007).
262. Niihori, T. *et al.* Germline KRAS and BRAF mutations in cardio-facio-cutaneous syndrome. *Nat. Genet.* **38**, 294–296 (2006).
263. Cirstea, I. C. *et al.* A restricted spectrum of NRAS mutations causes Noonan syndrome. *Nat. Genet.* **42**, 27–29 (2010).
264. Kraoua, L. *et al.* Constitutional NRAS mutations are rare among patients with Noonan syndrome or juvenile myelomonocytic leukemia. *Am. J. Med. Genet. A.* **158A**,

2407–2411 (2012).

265. De Filippi, P. *et al.* Germ-line mutation of the NRAS gene may be responsible for the development of juvenile myelomonocytic leukaemia. *Br. J. Haematol.* **147**, 706–709 (2009).

266. Stephen, A. G., Esposito, D., Bagni, R. K. & McCormick, F. Dragging ras back in the ring. *Cancer Cell* **25**, 272–281 (2014).

267. Fonseca, R. *et al.* International Myeloma Working Group molecular classification of multiple myeloma: spotlight review. *Leukemia* **23**, 2210–2221 (2009).

268. Chng, W. J. *et al.* Clinical and biological significance of RAS mutations in multiple myeloma. *Leukemia* **22**, 2280–2284 (2008).

269. Chesi, M. & Bergsagel, P. L. Molecular pathogenesis of multiple myeloma: basic and clinical updates. *Int. J. Hematol.* **97**, 313–323 (2013).

270. Trinquand, A. *et al.* Toward a NOTCH1/FBXW7/RAS/PTEN-based oncogenetic risk classification of adult T-cell acute lymphoblastic leukemia: a Group for Research in Adult Acute Lymphoblastic Leukemia study. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* **31**, 4333–4342 (2013).

271. Driessen, E. M. C. *et al.* Frequencies and prognostic impact of RAS mutations in MLL-rearranged acute lymphoblastic leukemia in infants. *Haematologica* **98**, 937–944 (2013).

272. Lübbert, M. *et al.* N-ras gene point mutations in childhood acute lymphocytic leukemia correlate with a poor prognosis. *Blood* **75**, 1163–1169 (1990).

273. Yokota, S. *et al.* Mutational analysis of the N-ras gene in acute lymphoblastic leukemia: a study of 125 Japanese pediatric cases. *Int. J. Hematol.* **67**, 379–387 (1998).

274. Turhan, A. G., Solary, E., Vainchenker, W. & Dusanter-Fourt, I. Molecular pathophysiology of chronic myelogenous leukemia. *Hematol. Cell Ther.* **40**, 217–221 (1998).

275. Lachenaud, J., Strullu, M., Baruchel, A. & Cavé, H. [Juvenile myelomonocytic leukemias]. *Bull. Cancer (Paris)* **101**, 302–313 (2014).

276. Niemeyer, C. M. & Kratz, C. P. Paediatric myelodysplastic syndromes and juvenile myelomonocytic leukaemia: molecular classification and treatment options. *Br. J. Haematol.* **140**, 610–624 (2008).

277. Altman, A. J., Palmer, C. G. & Baehner, R. L. Juvenile ‘chronic granulocytic’ leukemia: a panmyelopathy with prominent monocytic involvement and circulating

- monocyte colony-forming cells. *Blood* **43**, 341–350 (1974).
278. Locatelli, F. *et al.* Hematopoietic stem cell transplantation (HSCT) in children with juvenile myelomonocytic leukemia (JMML): results of the EWOG-MDS/EBMT trial. *Blood* **105**, 410–419 (2005).
279. Nakamura, Y. *et al.* Engraftment of NOD/SCID/gammac(null) mice with multilineage neoplastic cells from patients with juvenile myelomonocytic leukaemia. *Br. J. Haematol.* **130**, 51–57 (2005).
280. Chan, R. J., Cooper, T., Kratz, C. P., Weiss, B. & Loh, M. L. Juvenile myelomonocytic leukemia: a report from the 2nd International JMML Symposium. *Leuk. Res.* **33**, 355–362 (2009).
281. Takagi, M. *et al.* Autoimmunity and persistent RAS-mutated clones long after the spontaneous regression of JMML. *Leukemia* **27**, 1926–1928 (2013).
282. Imamura, M. *et al.* Juvenile myelomonocytic leukemia with less aggressive clinical course and KRAS mutation. *Pediatr. Blood Cancer* **51**, 569 (2008).
283. Doisaki, S. *et al.* Somatic mosaicism for oncogenic NRAS mutations in juvenile myelomonocytic leukemia. *Blood* **120**, 1485–1488 (2012).
284. Matsuda, K. *et al.* Spontaneous improvement of hematologic abnormalities in patients having juvenile myelomonocytic leukemia with specific RAS mutations. *Blood* **109**, 5477–5480 (2007).
285. Puthalakath, H. *et al.* ER stress triggers apoptosis by activating BH3-only protein Bim. *Cell* **129**, 1337–1349 (2007).
286. Branch, D. R. & Mills, G. B. pp60c-src expression is induced by activation of normal human T lymphocytes. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **154**, 3678–3685 (1995).
287. Irby, R. B. & Yeatman, T. J. Role of Src expression and activation in human cancer. *Oncogene* **19**, 5636–5642 (2000).
288. Frame, M. C., Fincham, V. J., Carragher, N. O. & Wyke, J. A. V-SRC'S HOLD OVER ACTIN AND CELL ADHESIONS. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **3**, 233–245 (2002).
289. Yeatman, T. J. A renaissance for SRC. *Nat. Rev. Cancer* **4**, 470–480 (2004).
290. Odajima, J. *et al.* Full oncogenic activities of v-Src are mediated by multiple signaling pathways. Ras as an essential mediator for cell survival. *J. Biol. Chem.* **275**, 24096–24105 (2000).
291. Reginato, M. J. *et al.* Bim regulation of lumen formation in cultured mammary epithelial acini is targeted by oncogenes. *Mol. Cell. Biol.* **25**, 4591–4601 (2005).

292. Reginato, M. J. *et al.* Integrins and EGFR coordinately regulate the pro-apoptotic protein Bim to prevent anoikis. *Nat. Cell Biol.* **5**, 733–740 (2003).
293. Giannoni, E. *et al.* Redox regulation of anoikis: reactive oxygen species as essential mediators of cell survival. *Cell Death Differ.* **15**, 867–878 (2008).
294. Giannoni, E., Fiaschi, T., Ramponi, G. & Chiarugi, P. Redox regulation of anoikis resistance of metastatic prostate cancer cells: key role for Src and EGFR-mediated pro-survival signals. *Oncogene* **28**, 2074–2086 (2009).
295. Bluteau, D. *et al.* Thrombocytopenia-associated mutations in the ANKRD26 regulatory region induce MAPK hyperactivation. *J. Clin. Invest.* **124**, 580–591 (2014).
296. Liu, H., Nakazawa, T., Tezuka, T. & Yamamoto, T. Physical and functional interaction of Fyn tyrosine kinase with a brain-enriched Rho GTPase-activating protein TCGAP. *J. Biol. Chem.* **281**, 23611–23619 (2006).
297. Gylfe, A. E. *et al.* Somatic mutations and germline sequence variants in patients with familial colorectal cancer. *Int. J. Cancer* **127**, 2974–2980 (2010).
298. Chowdhury, S. *et al.* Regulation of dipeptidyl peptidase 8 and 9 expression in activated lymphocytes and injured liver. *World J. Gastroenterol. WJG* **19**, 2883–2893 (2013).
299. Spagnuolo, P. A. *et al.* Inhibition of intracellular dipeptidyl peptidases 8 and 9 enhances parthenolide's anti-leukemic activity. *Leukemia* **27**, 1236–1244 (2013).
300. Shears, S. B., Weaver, J. D. & Wang, H. Structural insight into inositol pyrophosphate turnover. *Adv. Biol. Regul.* **53**, 19–27 (2013).
301. Jacomasso, T., Trombetta-Lima, M., Sogayar, M. C. & Winnischofer, S. M. B. Downregulation of reversion-inducing cysteine-rich protein with Kazal motifs in malignant melanoma: inverse correlation with membrane-type 1-matrix metalloproteinase and tissue inhibitor of metalloproteinase 2. *Melanoma Res.* **24**, 32–39 (2014).
302. Lin, Y.-W., Yan, M.-D., Shih, Y.-L. & Hsieh, C.-B. The basal body gene, RPGRIP1L, is a candidate tumour suppressor gene in human hepatocellular carcinoma. *Eur. J. Cancer* **45**, 2041–2049 (2009).
303. Lei, M. *et al.* [Expression and its clinical significance of SLC22A18 in non-small cell lung cancer]. *Zhongguo Fei Ai Za Zhi Chin. J. Lung Cancer* **15**, 17–20 (2012).
304. Lee, S.-Y. *et al.* Identification of the gonad-specific anion transporter SLC06A1 as a cancer/testis (CT) antigen expressed in human lung cancer. *Cancer Immun.* **4**, 13

(2004).

305. Pang, Y. *et al.* TGF- Signaling in Myeloid Cells Is Required for Tumor Metastasis. *Cancer Discov.* **3**, 936–951 (2013).
306. Salonen, J. *et al.* Differential developmental expression of transcription factors GATA-4 and GATA-6, their cofactor FOG-2 and downstream target genes in testicular carcinoma in situ and germ cell tumors. *Eur. J. Endocrinol.* **162**, 625–631 (2010).
307. Bodur, C. *et al.* Pramanicin analog induces apoptosis in human colon cancer cells: critical roles for Bcl-2, Bim, and p38 MAPK signaling. *PloS One* **8**, e56369 (2013).
308. Schneiders, U. M., Schyschka, L., Rudy, A. & Vollmar, A. M. BH3-only proteins Mcl-1 and Bim as well as endonuclease G are targeted in spongistatin 1-induced apoptosis in breast cancer cells. *Mol. Cancer Ther.* **8**, 2914–2925 (2009).
309. Zhou, C., Pan, W., Wang, X. P. & Chen, T. S. Artesunate induces apoptosis via a Bak-mediated caspase-independent intrinsic pathway in human lung adenocarcinoma cells. *J. Cell. Physiol.* **227**, 3778–3786 (2012).
310. Karimi, M., Johansson, S. & Ekström, T. J. Using LUMA: a Luminometric-based assay for global DNA-methylation. *Epigenetics Off. J. DNA Methylation Soc.* **1**, 45–48 (2006).
311. Zheng, Y., Chen, K.-L., Zheng, X.-M., Li, H.-X. & Wang, G.-L. Identification and bioinformatics analysis of microRNAs associated with stress and immune response in serum of heat-stressed and normal Holstein cows. *Cell Stress Chaperones* (2014). doi:10.1007/s12192-014-0521-8
312. Wang, S.-Y. *et al.* miR-19, miR-345, miR-519c-5p serum levels predict adverse pathology in prostate cancer patients eligible for active surveillance. *PloS One* **9**, e98597 (2014).
313. Schou, J. V. *et al.* miR-345 in Metastatic Colorectal Cancer: A Non-Invasive Biomarker for Clinical Outcome in Non-KRAS Mutant Patients Treated with 3rd Line Cetuximab and Irinotecan. *PloS One* **9**, e99886 (2014).
314. Tang, J.-T. *et al.* MicroRNA 345, a methylation-sensitive microRNA is involved in cell proliferation and invasion in human colorectal cancer. *Carcinogenesis* **32**, 1207–1215 (2011).
315. Jacobs, A. T. & Marnett, L. J. HSF1-mediated BAG3 expression attenuates apoptosis in 4-hydroxynonenal-treated colon cancer cells via stabilization of anti-apoptotic Bcl-2 proteins. *J. Biol. Chem.* **284**, 9176–9183 (2009).

316. Laddha, S. V. *et al.* Genome-wide analysis reveals downregulation of miR-379/miR-656 cluster in human cancers. *Biol. Direct* **8**, 10 (2013).
317. Guo, M. *et al.* miR-656 inhibits glioma tumorigenesis through repression of BMPR1A. *Carcinogenesis* **35**, 1698–1706 (2014).
318. Sun, D. *et al.* MicroRNA-31 activates the RAS pathway and functions as an oncogenic MicroRNA in human colorectal cancer by repressing RAS p21 GTPase activating protein 1 (RASA1). *J. Biol. Chem.* **288**, 9508–9518 (2013).
319. Wang, X. *et al.* MicroRNA-494 targeting both proapoptotic and antiapoptotic proteins protects against ischemia/reperfusion-induced cardiac injury. *Circulation* **122**, 1308–1318 (2010).
320. Sun, G. *et al.* Over-expression of microRNA-494 up-regulates hypoxia-inducible factor-1 alpha expression via PI3K/Akt pathway and protects against hypoxia-induced apoptosis. *J. Biomed. Sci.* **20**, 100 (2013).
321. Zhao, J.-J. *et al.* Identification of miRNAs associated with tumorigenesis of retinoblastoma by miRNA microarray analysis. *Childs Nerv. Syst. ChNS Off. J. Int. Soc. Pediatr. Neurosurg.* **25**, 13–20 (2009).
322. De Leeuw, D. C. *et al.* Attenuation of microRNA-126 expression that drives CD34+38- stem/progenitor cells in acute myeloid leukemia leads to tumor eradication. *Cancer Res.* **74**, 2094–2105 (2014).
323. Guo, C. *et al.* The noncoding RNA, miR-126, suppresses the growth of neoplastic cells by targeting phosphatidylinositol 3-kinase signaling and is frequently lost in colon cancers. *Genes. Chromosomes Cancer* **47**, 939–946 (2008).
324. Katayama, Y. *et al.* Identification of pathogenesis-related microRNAs in hepatocellular carcinoma by expression profiling. *Oncol. Lett.* **4**, 817–823 (2012).
325. Xiao, Z.-G., Deng, Z.-S., Zhang, Y.-D., Zhang, Y. & Huang, Z.-C. Clinical significance of microRNA-93 downregulation in human colon cancer. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* **25**, 296–301 (2013).
326. Fu, X., Tian, J., Zhang, L., Chen, Y. & Hao, Q. Involvement of microRNA-93, a new regulator of PTEN/Akt signaling pathway, in regulation of chemotherapeutic drug cisplatin chemosensitivity in ovarian cancer cells. *FEBS Lett.* **586**, 1279–1286 (2012).
327. Zhong, M., Bian, Z. & Wu, Z. miR-30a suppresses cell migration and invasion through downregulation of PIK3CD in colorectal carcinoma. *Cell. Physiol. Biochem. Int. J. Exp. Cell. Physiol. Biochem. Pharmacol.* **31**, 209–218 (2013).

328. Xue, L. *et al.* Siva-1 binds to and inhibits BCL-X(L)-mediated protection against UV radiation-induced apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**, 6925–6930 (2002).
329. Chu, F. *et al.* The Siva-1 putative amphipathic helical region (SAH) is sufficient to bind to BCL-XL and sensitize cells to UV radiation induced apoptosis. *Apoptosis Int. J. Program. Cell Death* **9**, 83–95 (2004).
330. Gudi, R. *et al.* Siva-1 negatively regulates NF-kappaB activity: effect on T-cell receptor-mediated activation-induced cell death (AICD). *Oncogene* **25**, 3458–3462 (2006).
331. Fortin, A. *et al.* The proapoptotic gene SIVA is a direct transcriptional target for the tumor suppressors p53 and E2F1. *J. Biol. Chem.* **279**, 28706–28714 (2004).
332. Shi, W.-Y., Che, C.-Y. & Liu, L. Human interleukin 23 receptor induces cell apoptosis in mammalian cells by intrinsic mitochondrial pathway associated with the down-regulation of RAS/mitogen-activated protein kinase and signal transducers and activators of transcription factor 3 signaling pathways. *Int. J. Mol. Sci.* **14**, 24656–24669 (2013).
333. Song, N. *et al.* Genetic variants in interleukin-2 and risk of lymphoma among children in Korea. *Asian Pac. J. Cancer Prev. APJCP* **13**, 621–623 (2012).
334. Coxon, A. *et al.* A novel role for the beta 2 integrin CD11b/CD18 in neutrophil apoptosis: a homeostatic mechanism in inflammation. *Immunity* **5**, 653–666 (1996).
335. Weinmann, P., Scharffetter-Kochanek, K., Forlow, S. B., Peters, T. & Walzog, B. A role for apoptosis in the control of neutrophil homeostasis in the circulation: insights from CD18-deficient mice. *Blood* **101**, 739–746 (2003).
336. Atallah, M. *et al.* Constitutive neutrophil apoptosis: regulation by cell concentration via S100 A8/9 and the MEK-ERK pathway. *PloS One* **7**, e29333 (2012).
337. Scholl, C. *et al.* Synthetic lethal interaction between oncogenic KRAS dependency and STK33 suppression in human cancer cells. *Cell* **137**, 821–834 (2009).
338. Azoitei, N. *et al.* Targeting of KRAS mutant tumors by HSP90 inhibitors involves degradation of STK33. *J. Exp. Med.* **209**, 697–711 (2012).
339. Wurthner, J. U. *et al.* Transforming growth factor-beta receptor-associated protein 1 is a Smad4 chaperone. *J. Biol. Chem.* **276**, 19495–19502 (2001).
340. Zhang, T. *et al.* Overexpression of DLC-1 induces cell apoptosis and proliferation inhibition in the renal cell carcinoma. *Cancer Lett.* **283**, 59–67 (2009).
341. Yang, C. *et al.* DLC1 as a regulator of proliferation, invasion, cell cycle, and

apoptosis in cutaneous squamous cell carcinoma. *Tumour Biol. J. Int. Soc. Oncodevelopmental Biol. Med.* **34**, 2633–2643 (2013).

342. Bröker, L. E. *et al.* Cathepsin B mediates caspase-independent cell death induced by microtubule stabilizing agents in non-small cell lung cancer cells. *Cancer Res.* **64**, 27–30 (2004).

343. Michallet, M.-C. *et al.* Cathepsin-B-dependent apoptosis triggered by antithymocyte globulins: a novel mechanism of T-cell depletion. *Blood* **102**, 3719–3726 (2003).

344. Michallet, M.-C., Saltel, F., Flacher, M., Revillard, J.-P. & Genestier, L. Cathepsin-dependent apoptosis triggered by supraoptimal activation of T lymphocytes: a possible mechanism of high dose tolerance. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **172**, 5405–5414 (2004).

345. Yuan, B. Z. *et al.* Cloning, characterization, and chromosomal localization of a gene frequently deleted in human liver cancer (DLC-1) homologous to rat RhoGAP. *Cancer Res.* **58**, 2196–2199 (1998).

346. Lahoz, A. & Hall, A. DLC1: a significant GAP in the cancer genome. *Genes Dev.* **22**, 1724–1730 (2008).

347. Feng, M., Huang, B., Du, Z., Xu, X. & Chen, Z. DLC-1 as a modulator of proliferation, apoptosis and migration in Burkitt's lymphoma cells. *Mol. Biol. Rep.* **38**, 1915–1920 (2011).

348. Zhang, T. *et al.* Overexpression of DLC-1 induces cell apoptosis and proliferation inhibition in the renal cell carcinoma. *Cancer Lett.* **283**, 59–67 (2009).

349. Zhou, X., Thorgeirsson, S. S. & Popescu, N. C. Restoration of DLC-1 gene expression induces apoptosis and inhibits both cell growth and tumorigenicity in human hepatocellular carcinoma cells. *Oncogene* **23**, 1308–1313 (2004).

350. Van Rijssel, J. & van Buul, J. D. The many faces of the guanine-nucleotide exchange factor trio. *Cell Adhes. Migr.* **6**, 482–487 (2012).

351. Kajiho, H. *et al.* Characterization of RIN3 as a guanine nucleotide exchange factor for the Rab5 subfamily GTPase Rab31. *J. Biol. Chem.* **286**, 24364–24373 (2011).

352. Fritz, R. D. & Radziwill, G. CNK1 and other scaffolds for Akt/FoxO signaling. *Biochim. Biophys. Acta* **1813**, 1971–1977 (2011).

353. Sun, T. T. *et al.* Disrupted interaction between CFTR and AF-6/afadin aggravates malignant phenotypes of colon cancer. *Biochim. Biophys. Acta* **1843**, 618–628 (2014).

354. Fournier, G. *et al.* Loss of AF6/afadin, a marker of poor outcome in breast cancer,

induces cell migration, invasiveness and tumor growth. *Oncogene* **30**, 3862–3874 (2011).

355. Jandrig, B. *et al.* ST18 is a breast cancer tumor suppressor gene at human chromosome 8q11.2. *Oncogene* **23**, 9295–9302 (2004).

356. Yang, J., Siqueira, M. F., Behl, Y., Alikhani, M. & Graves, D. T. The transcription factor ST18 regulates proapoptotic and proinflammatory gene expression in fibroblasts. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* **22**, 3956–3967 (2008).

357. Zeng, L. *et al.* Death receptor 6 induces apoptosis not through type I or type II pathways, but via a unique mitochondria-dependent pathway by interacting with Bax protein. *J. Biol. Chem.* **287**, 29125–29133 (2012).

358. Richter, B. W. *et al.* Molecular cloning of ILP-2, a novel member of the inhibitor of apoptosis protein family. *Mol. Cell. Biol.* **21**, 4292–4301 (2001).

359. McCarthy, J. V., Ni, J. & Dixit, V. M. RIP2 is a novel NF-kappaB-activating and cell death-inducing kinase. *J. Biol. Chem.* **273**, 16968–16975 (1998).

360. Rautureau, G. J. P. *et al.* The restricted binding repertoire of Bcl-B leaves Bim as the universal BH3-only prosurvival Bcl-2 protein antagonist. *Cell Death Dis.* **3**, e443 (2012).

361. Bertin, J. *et al.* CARD9 is a novel caspase recruitment domain-containing protein that interacts with BCL10/CLAP and activates NF-kappa B. *J. Biol. Chem.* **275**, 41082–41086 (2000).

362. Philpott, D. J. & Viala, J. Towards an understanding of the role of NOD2/CARD15 in the pathogenesis of Crohn's disease. *Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.* **18**, 555–568 (2004).

363. Abe, S. *et al.* Bone marrow cells of myelodysplastic syndromes exhibit significant expression of apollon, livin and ILP-2 with reduction after transformation to overt leukemia. *Leuk. Res.* **29**, 1095–1096 (2005).

364. Wang, L., Zhang, Q., Liu, B., Han, M. & Shan, B. Challenge and promise: roles for Livin in progression and therapy of cancer. *Mol. Cancer Ther.* **7**, 3661–3669 (2008).